



Phytoremédiation des organochlorés. Etude mécanistique et fonctionnelle des capacités épuratrices du système plante-rhizosphère

Angélique San Miguel

► To cite this version:

Angélique San Miguel. Phytoremédiation des organochlorés. Etude mécanistique et fonctionnelle des capacités épuratrices du système plante-rhizosphère. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENS030 . tel-00680031

HAL Id: tel-00680031

<https://theses.hal.science/tel-00680031>

Submitted on 17 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Grenoble

Spécialité :

Modèles, Méthodes et Algorithmes en biologie, santé et environnement (MBS)

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Angélique SAN MIGUEL

Thèse dirigée par **Patrick Ravanel** et
codirigée par **Muriel Raveton**

Préparée au sein du **Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA)**
dans l'**Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la
Cognition et l'Environnement (EDISCE)**

***Phytoremédiation des organochlorés. Etude
mécanistique et fonctionnelle des capacités
épurations du système plante-rhizosphère***

Thèse soutenue publiquement le 1^{er} décembre 2011

Michel Couderchet

Professeur - Université de Reims, *Rapporteur*

Michel Mench

Directeur de Recherche - INRA de Bordeaux, *Rapporteur*

Laurent Lagadic

Directeur de Recherche - INRA de Paris, *Examineur*

Christian Mougin

Directeur de Recherche - INRA de Versailles, *Examineur*

Patrick Ravanel

Professeur - Université de Grenoble, *Directeur de thèse*

Muriel Raveton

Maître de Conférence - Université de Grenoble, *Directrice de thèse*



Table des matières

Remerciements	5
Résumé.....	11
Abstract.....	13
Liste des abréviations	14
Liste des figures et tableaux	17
Introduction	24
1. Contexte général	24
1.1 Les sources de pollutions issues des activités anthropiques.....	24
1.2 Le renforcement des mesures règlementaires et législatives européennes.....	28
2. Les organochlorés (OCs).....	30
2.1 Définition et Historique des OCs	30
2.2 Le Lindane (γ -HCH).....	32
2.3 Les chlorobenzènes (CBs).....	39
3. Les moyens de lutte contre cette pollution	44
3.1 Analyse de l'état d'un écosystème.....	44
3.2 Techniques de traitement de la pollution.....	46
3.3 L'utilisation d'organismes vivants pour le traitement in situ de sites pollués : la phytoremédiation.....	49
3.3.1 Historique.....	49
3.3.2 Les aspects économiques.....	51
3.3.3 Les différents mécanismes de phytoremédiation.....	52
4. Phytotoxicité et Stress oxydant chez les plantes exposées à la pollution	57
4.1 Phytotoxicité décrite pour les OCs.....	57
4.2 Le Stress oxydant lié à l'exposition aux polluants.....	59
4.2.1 Les Espèces Réactives de l'Oxygène	59
4.2.2 Les moyens de défense contre le stress oxydant chez les plantes.....	61
a. Les peroxydases (POD)	63
b. Glutathion réductase (GR)	65
5. Phytotolérance et détoxification des polluants dans les tissus végétaux.....	66
5.1 Généralités sur la tolérance biochimique.....	66
5.2 Les enzymes de phase I et les organochlorés	69
5.3 Les enzymes de phase II et les organochlorés	70

5.3.1	Les glutathion-S-transférases (GSTs)	70
5.3.2	Les glycosyltransférases (GTs)	73
6.	Rôle des microorganismes associés aux plantes	77
6.1	La Rhizosphère, un lieu d'échange et d'interactions plante/bactéries.....	77
6.2	Biodégradation des OCs dans les sols	81
6.2.1	Métabolisation du lindane.....	81
6.2.2	Métabolisation des chlorobenzènes.....	85
7.	Objectifs de l'étude	87
7.1	Le matériel végétal.....	89
7.1.1	<i>Zea mays</i>	89
7.1.2	<i>Phragmites australis</i>	90
7.2	Plan de l'étude doctorale.....	91
7.3	Communications scientifiques durant la thèse.....	95
Chapitre I : Évaluation de la phytotoxicité des OCs sur <i>Z. mays</i> et <i>P. australis</i>		99
I.	Problématique et démarche de l'étude	99
II.	Approche expérimentale	100
III.	Résultats et discussion	102
1.	Phytotoxicité en mono-exposition.....	102
1.1.	Évaluation des effets morphologiques en fonction des concentrations d'exposition aux OCs.....	102
1.2.	Mesure du stress oxydant.....	104
1.3.	Tolérance des plantes aux OCs.....	107
2.	Multi-exposition.....	109
2.1.	Effet synergique/cumulatif du mélange des OCs.....	109
2.2.	Suivi du stress oxydant en fonction du temps d'exposition	110
IV.	Conclusions	112
Publication 1		114
Publication 2		126
Chapitre II : Mise en évidence de l'absorption des organochlorés (OCs) par la plante		147
I.	Problématique et démarche de l'étude	147
II.	Approche expérimentale	148
1.	Conditions d'exposition	148
2.	Mesure de la phytoextraction.....	149
III.	Résultats et discussions	150
1.	Absorption racinaire des polluants.....	150
2.	Absorption par la plante entière.....	152
3.	Mécanisme de translocation des ¹⁴ C-OCs dans la plante.....	153

4. Mise en évidence du mécanisme de phytovolatilisation	156
IV. Conclusion	158
Publication 3	160
<i>Chapitre III : Étude des activités enzymatiques de détoxication chez p. australis.....</i>	<i>185</i>
I. Problématique et démarche de l'étude	185
1. Contexte général.....	185
2. Approche expérimentale.....	186
II. Résultats et discussion	188
1. Impact des OCs en mono-exposition sur les activités GSTs et UGTs.....	188
2. Impact des OCs en multi-exposition sur les activités GSTs et UGTs	190
III. Conclusions	192
Publication 4	196
<i>Chapitre IV : Étude des communautés bactériennes de la rhizosphere.....</i>	<i>213</i>
I. Problématique et démarche de l'étude	213
1. Contexte général.....	213
2. Approche expérimentale.....	214
II. Résultats et discussion	215
III. Conclusions	225
Publication 5	228
<i>Discussion générale</i>	<i>253</i>
<i>Perspectives.....</i>	<i>264</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>306</i>

Remerciements

En préambule à ce manuscrit, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et leur soutien durant toutes ces années, en contribuant à l'élaboration ainsi qu'à la réussite de mon doctorat. Voilà bien 6 ans maintenant que je cours dans les couloirs et entre les différents étages du **Laboratoire d'Écologie Alpine**... Débutant avec un stage de Master 1, j'ai enchaîné les années d'études : Master 2, Diplôme Universitaire, puis enfin la thèse, au sein de l'équipe **PEX** (Perturbations Environnementales et Xénobiotiques), devenu **P3E** entre temps (Pollution, Environnement, Écotoxicologie et Écoremédiation).

Pour cela et en premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur **Patrick Ravanel**, sans qui je ne serais là aujourd'hui. De très bons conseils, toujours prêt à nous épauler dans les meilleurs comme dans les pires moments, je te remercie de m'avoir ouvert les portes de ton équipe, de m'avoir donné une chance de pouvoir travailler dans le domaine de l'écotoxicologie, ainsi que ta confiance. La haut-savoyarde d'origine espagnole que tu as reçu avec un grand sourire et un "bienvenue, dans l'équipe nous aimons la biodiversité", t'en est très reconnaissante et n'oubliera pas...

Par la suite je souhaite remercier le Docteur **Stéphane Reynaud**, tout nouveau chef responsable de l'équipe P3E, mais également, une des personnes les plus appréciées du laboratoire et de moi même. Je te remercie pour ta bonne humeur et la bonne ambiance apportée au sein de l'équipe, des qualités très appréciables au quotidien. Merci également pour ces bons moments de discussions scientifiques et autres, autour d'une tasse de thé et des croissants du vendredi matin. Cela fut un réel plaisir de travailler avec toi, "Roi Stéphane" pour les intimes...

Un très grand merci tout particulier pour ma directrice de thèse, le Docteur **Muriel Raveton**, qui est sans hésiter, la personne qui m'aura appris et apporté le plus dans cette expérience scientifique depuis mes débuts. Je me souviens encore des tes cours en écotoxicologie, à l'issue desquels j'ai su que c'était dans ce domaine que je voulais continuer et persévérer. Alors tu m'as donné une chance, les outils nécessaires, puis de fil en aiguille j'ai "grandi" à tes côtés. Merci pour tes bons conseils, pour ton aide, pour les bons moments passés en congrès scientifiques, j'ai beaucoup aimé les découvertes culinaires et culturelles avec toi. Merci encore pour m'avoir encouragé lors des communications orales, pour la réalisation de la mission en Allemagne et pour m'avoir aidé à relever la tête lors des moments difficiles. Pendant ces 6 ans d'étude, tu auras été un professeur, une amie, voir même une "grande sœur", ne m'appelle-t-on pas mini Mu? Merci pour tout et à très bientôt je l'espère sincèrement...

Je remercie également **Pierre Taberlet** pour m'avoir accueillie au laboratoire et **Irène Till-Bottraud** nouvelle directrice, pour sa gentillesse et son soutien.

J'aimerais remercier les membres du jury, **Michel Mench**, **Michel Couderchet**, **Christian Mougin** et **Laurent Lagadic**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de bien vouloir évaluer et examiner mon travail de thèse. Je vous remercie tous de répondre présents aujourd'hui. Je remercie également **Agnès Pilas-Begue** sans qui, le projet n'aurait jamais vu le jour, ainsi que tous les partenaires qui ont travaillé autour : Phytorestore, Rhodia, le LOCIE et le CNRS.

Je remercie tous les membres du **COST 859** qui m'ont accordé le soutien financier nécessaire pour ma mission de 3 mois en Allemagne (Munich). Un très grand merci au professeur **Peter Schröder** pour m'avoir accueilli et à toute son équipe : *A particulary thank to Pr. Peter Schröder who welcomed me in his working group Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen, provided me an additional experience in the research and gave me good advices during the stay. Thank you very much all the Post-Doctoral, PhD, and Diploma students Lyudmil Lyubenova, Bernadett, Tina Riedel, Christian Huber and Maximilian Krönauer for your help and friendly welcome. A very big thank to the technician Rudolf Harpaintner, for his patience, support and cooperation. I found him good trainer, gentale and welcoming during the stay.*

Ce travail n'aurait pas été le même sans les stagiaires et toutes les petites mains qui m'auront aidé à la culture et au "dépiotage" des plantes, merci à **Emma Rossetto** ; mais également à la réalisation d'expériences, merci à **Mathieu Faure** et à **Marc Méléсан**. J'ai pris grand plaisir à travailler avec vous, de façon efficace et dans une très bonne ambiance.

Mes chers collègues du bureau 219, notamment **Rodolphe Poupardin** et **Asam Riaz**, je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble, les fous rires, votre humour, les petites sorties en dehors du laboratoire et pour cette complicité qui me manquera aussi beaucoup. **Rodolphe**, à très bientôt pour une visite chez les Rosbeefs ! Et **Asam**, surtout tiens nous au courant pour la suite !

Je remercie **Michel Tissut**, retraité bénévole au laboratoire. Combien il est appréciable de te croiser dans les couloirs avec ton cher et tendre compagnon à quatre pattes nommé Bilbo alias Bibi. Fidel à toi-même, passionné et un peu filou, merci pour ta bonne humeur au quotidien, pour les belles histoires et ta grande expérience. Tu enrichis notre culture générale et scientifique à chacune de nos discussions. Saches aussi, que je n'oublierai pas tes petites attentions, telles que les jolis petits vers de terre bien gras que tu m'as si gentiment offert lors de mon master (pour des expériences en toxicologie) et qui ne sentaient pas vraiment la rose. Et je te fais la promesse **Michel**, que la "Pocket-Angel" fera très attention lorsqu'elle ira se promener au bord du Fier, à éviter les voyous ! Je te remercie encore pour ta gentillesse et pour tout...

Je tiens également à remercier, **Sylvie Veyrenc** pour son aide, sa bonne humeur au quotidien et pour ses fous rires communicatifs jusqu'au bout du couloir ! **Lucile Sage**, "vive les champignons", toujours très serviable avec les étudiants et de bons conseils.

Merci à **Thierry Gaude** et **Joëlle Patouraux**, pour leurs services et pour le montage des expériences. **Joëlle** tu as toujours été très aimable avec moi et m'a accueillie les bras ouverts, merci et bonne retraite.

Merci à **Delphine Rioux, Ludovic Gielly, Christian Miquel, Carole Poillot et Armelle Monier**, pour leur gentillesse, leur aide et leur confiance sur la plate-forme MarMol. **Armelle** merci pour le partage de tes connaissances et ton soutien, tu as été d'une grande aide en microbiologie avec la participation de **Bahar Shahnava** et de **Tarfa Mustafa**, sans qui je n'aurais pu réaliser cette partie de la thèse.

Merci également à **Julien Roy** pour sa patience et ses compétences statistiques en microbiologie. Je suis désolée de ne pas t'avoir laissé tranquille les derniers temps. Combien de questions j'ai dû te poser? Des tonnes ! Tu as fait du bon travail, merci. Par la même occasion je voudrais remercier **Roberto Alejandro Geremia** et **Jérôme Gury**, pour avoir été mes professeurs microbiologistes et pour leur collaboration.

La partie administrative et le bon déroulement de la thèse n'auraient pu se faire sans l'aide de mes secrétaires préférées, **Joëlle Paparella** que je remercie grandement pour ses services et son amitié, **Florence Sagnimorte** et **Kim Pla** pour leur gentillesse et toutes les démarches administratives entreprises pour moi.

Je voudrais remercier également tous mes amis pour m'avoir soutenu, pour leurs bons conseils et leur gentillesse durant toutes ces années. **Mickaël Catinon**, merci pour ces moments de détente à discuter, pour tes week end organisés dans le pays de la châtaigne et de la Terrine ! Tu es un ami fidèle avec qui j'ai passé de très bons moments depuis ces 6 ans et que j'apprécie beaucoup. **Guillaume Tétreau**, combien de fous rires avec toi ! Tu as une perception de la vie très intéressante avec des idées sans aucun doute révolutionnaires et ma foi, je t'encourage à persévérer. Merci de m'avoir encouragé, de tes grands coups de pouce et pour ton amitié. **Alexia Chandor-Proust**, je te remercie beaucoup, nous nous connaissons que depuis presque 2 ans et nous avons déjà passé de nombreux bons moments en dehors du laboratoire et en particulier en ballade avec les deux affreux Eliot et Mango. J'espère conserver cette amitié encore longtemps. **Mathieu Faure**, plus qu'un stagiaire tu es avant tout un très bon ami et je pense très sincèrement que tu es également une personne de grand cœur que j'apprécie énormément. Tu te démenes souvent comme un fou pour satisfaire tout le monde, tu acceptes de partir parfois tard du labo pour rendre service et nombreux sont encore les exemples que je ne cite ici. A côté de ça, tu peux parfois être un peu "casse pieds", mais c'est comme ça que je t'adore. Merci et ne change surtout pas.

Claire Molitor, entre les toutous de la SPA, les soirées, les ballades et les bonnes bières allemandes, que de bons moments de plaisirs partagés. J'espère que tu trouveras enfin ton bonheur, qui sait, peut être au pays de Couillu le Caribou ? Et à très bientôt dans nos montagnes. **Kévin Moreau**, merci beaucoup pour les soirées et pour tes belles créations qui nous feront toujours autant rêver. **Fabien Laurent, Emma Rossetto, Aurélien Desauvay, Marie-Audrey Kintana**, joyeuse bande de bons vivants, merci pour les moments de détente.

Je ne peux également oublier de remercier **Aurélie Gauthier, Alexandre Proust, Emilie Damour, Jessica Roux, Cindy Arnoldi, Nicolas Legay, Frédéric Laporte, Tarfa Mustafa, Ozgür Kilic, Benoît Cortinovis, Isabelle Worms, Olivier Lontin** et tous ceux que je ne cite ici, avec qui j'ai partagé également d'excellents moments. Merci à **Fabrice**

Grassein, tes conseils en photographie apportent leurs fruits petit à petit et rendez vous dans quelques mois en Irlande pour la saison des migrations !

Pour tous les ex-doctorants, doctorants ou stagiaires passés au laboratoire, pour leur motivations et la bonne ambiance : **Julien Sérandour (Rourou)**, **Pierre-François Chaton (PF)**, **Alice Valentini**, **Bénédicte Poncet**, **Margot Paris**, **Lucie Zinger**, **Romain Blanc-Mathieu**, **Renault Stalinski**, **Benjamin Dufils**, **Johanna Marçais**, **Frédéric Faucon**, **Marion Maret**, **Catherine Fallecker**, **Charlène Thedevuide**, et j'en oublie... Un grand merci ! Je souhaite une très bonne continuation et beaucoup de réussite pour la suite, aux deux nouvelles doctorantes du bureau 219, **Claire Blondel** et **Sophie Prudhomme**. **Claire** je te cède volontiers mon bureau, c'est la meilleure place !

Pour finir, je ne peux omettre de consacrer quelques lignes de remerciements aux personnes les plus chères à mes yeux. Tout d'abord, A mon père **Julián San Miguel**, que beaucoup connaissent déjà pour avoir parlé de lui de nombreuses fois. Merci de m'avoir permis d'accéder aux études et au savoir, tu auras été mon moteur durant ces longues années et sans toi je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir donné les options pour avancer, pour ta confiance et les sacrifices, et pour avoir toujours répondu présent. Le métier que tu fais est l'un des plus beaux mais aussi l'un des plus durs, celui de menuisier/ébéniste et c'est également pour cela que tu es sans aucun doute la personne que j'admire le plus et dont je suis très fière. A ma mère **Eliane San Miguel**, qui m'aura apporté tout le réconfort et le soutien dont j'avais besoin à chaque instant et en particulier durant ces longues années d'études. Je te remercie pour ta tendresse, ton écoute et de tous les bons moments partagés ensemble. Ces passions que j'ai pour la nature et l'environnement me viennent de vous.

Je ne peux oublier ma sœur **Émilie**. Depuis que je suis dans les études, tu n'auras eu de cesse de prendre de mes nouvelles, d'être proche et ma plus grande confidente. Je te remercie pour ta présence et n'oublierai pas tous tes messages de soutien jusqu'à la concrétisation de ma thèse. Et puis, je suis la plus heureuse des tatas aujourd'hui ! Et je remercie également **Hadrien** un beau-frère adorable.

A **Benjamin Demarthe**, pour avoir subi mes sautes d'humeurs, surtout vers la fin de la thèse en étant très patient avec moi. Tu m'accompagnes chaque jour et sur ce petit bout de chemin de 3 ans, tu auras toujours été là pour m'épauler, me remonter le moral, me faire rire, m'apporter beaucoup de bonheur, me supporter parfois aussi... Tu es une personne que j'estime à qui je tiens énormément et pour tout cela et bien d'autres encore, je te remercie de tout mon cœur...

A **Mango**, car je ne pouvais ne pas l'introduire ici, le plus drôle des compagnons à quatre pattes, qui partage également cette aventure de la thèse depuis 3 ans. Un très bon anti-stress au quotidien !

Je n'oublie pas non plus, les autres membres de ma famille en France et en Espagne. En particulier mes grands parents **Josefina** et **Valerio San Miguel**, partis pendant ma thèse. Je leur fais hommage ici car ils sont la source des souvenirs les plus beaux de mon enfance, de beaucoup de bonheur et d'encouragements. *Gracias por haber estado a mi*

lado y por haberme enseñado tantas cosas. Os echo mucho de menos porque a pesar de haber pasado muchos momentos con vosotros no he podido pasar tanto tiempo como yo lo hubiera querido. Os quiero y no os olvido...

Enfin, un autre grand merci à toute la famille **Demarthe**, en particulier **Clotilde** ainsi qu'à **Marina Soares** mes deux amies d'enfance, que j'apprécie beaucoup, et qui m'ont également beaucoup apporté et soutenu les derniers temps.

Et c'est ainsi que s'achève ce long voyage semé de connaissances, de rencontres, parfois d'embûches mais également de découvertes diverses et de richesses intérieures...

Angélique

Phytoremédiation des organochlorés. Etude mécanistique et fonctionnelle des capacités épuratrices du système plante-rhizosphère.

Résumé

Les organochlorés (OCs) -molécules utilisées dans des procédés industriels et en applications agricoles, sont actuellement pour la plupart interdites d'utilisation- sont considérés comme des polluants très persistants représentant une menace pour les eaux de surfaces et souterraines, le sol et l'atmosphère. Des méthodes de décontamination de sites pollués aux OCs sont développées utilisant des technologies *in situ* d'écoremédiation. L'objectif de cette thèse est d'étudier les capacités de phytoremédiation des OCs par deux plantes modèles, *Zea mays* et *Phragmites australis*. Les OCs choisis dans cette étude sont, le lindane (γ -HCH), le monochlorobenzène (MCB), le 1,4-dichlorobenzène (DCB) et le 1,2,4-trichlorobenzène (TCB). Notre approche a été de mesurer leur impact sur les fonctions physiologiques des plantes pour chaque OC en mono-exposition, puis de comparer ces mêmes réponses physiologiques en multi-exposition. Suite à la mesure de la toxicité des OCs sur les plantes étudiées (biomasse, quantité de chlorophylles), les concentrations maximales n'induisant aucun effet toxique (NOEC_{7jours}) sont respectivement de 0,7 ; 10 ; 0,8 et 0,8 mg l⁻¹ pour γ -HCH, TCB, DCB et MCB. Ce travail a permis de mettre en évidence également un effet synergique de l'action du mélange des OCs. Le mélange ne provoquant pas de phytotoxicité (NOEC_{7jours}) est : 0,2 mg l⁻¹ MCB + 0,2 mg l⁻¹ DCB + 2,5 mg l⁻¹ TCB + 0,175 mg l⁻¹ HCH. *Z. mays* et *P. australis* tolèrent ainsi des concentrations en mélange des OCs largement supérieures (facteur 15) aux concentrations environnementales décrites dans la littérature.

Les plantes (*P. australis*) sont capables d'absorber les OCs (détectés par marquage ¹⁴C) au cours du temps d'exposition (7 jours) avec un rendement mesuré de 1,3 ± 0,4 % DCB, 5,99 ± 2 % TCB et 13,91 ± 5,6 % γ -HCH. La répartition des OCs dans la plante montre une bioconcentration majoritaire au niveau des organes souterrains (racines et rhizomes) des plantes. Par ailleurs, les OCs sont transférés au sein des plantes -des racines vers les parties aériennes- dont l'intensité est statistiquement corrélée à la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de chaque OCs. Par conséquent, la voie de transfert empruntée semble être le flux xylémien dont l'intensité repose sur le flux transpiratoire et un flux gazeux circulant dans les espaces aérénchymateux des macrophytes. Suite à ce transfert, une part des OCs est phytovolatilisée à partir des surface foliaires (à 28 jours : 0,09 % DCB, 0,02 % TCB et 0,03 % γ -HCH).

Les activités enzymatiques de détoxification de phase II (GSTs, UGTs) montrent une induction potentielle des UGTs (feuilles) lors d'une exposition en mélange des OCs. Dans ces mêmes conditions, les activités GSTs ne sont pas modifiées.

Enfin, cette étude montre une adaptation de la microflore bactérienne de la rhizosphère en présence d'un gradient d'exposition aux OCs (multi-exposition). Les approches d'isolement et d'études d'empreintes moléculaires (ARNr 16S, SSCP, pyroséquançage

454) ont permis de détecter des souches potentiellement capables d'assurer une rhizodégradation des OCs telles que *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. et *Rhodococcus* sp., reconnus pour leur capacité à dégrader certains polluants organiques chlorés.

Organochlorine phytoremediation. Resilience efficiency of the plant-rhizosphere system (A mechanistic and functional approach).

Abstract

Organochlorines (OCs) -molecules which used in industrial processes or for agricultural applications are prohibited from use nowadays- As they are classified as very persistent pollutants and show an environmental risk for surface water and groundwater, soil and atmosphere. To restore polluted sites, alternative methods are developed using ecoremediation technologies *in situ*. The aim of this thesis is to study the OCs phytoremediation capacities using two model plants, *Zea mays* and *Phragmites australis*. OCs selected for this work are lindane (γ HCH), monochlorobenzene (MCB), 1,4-dichlorobenzene (DCB) and 1,2,4-trichlorobenzene (TCB). The work strategy was to compare the effects on plant physiological functions when plants were exposed to each OC (mono-exposure) and to a mixture of all OCs (multi-exposure). Further to the evaluation of the OCs toxicity on studied plants (as shown by biomass, quantity of chlorophylls), concentrations which don't lead any toxic effect (NOEC_{7days}) were studied and reached respectively 0.7, 10, 0.8 and 0.8 mg l⁻¹ for γ HCH, TCB, DCB and MCB.

This study highlighted a synergistic effect of the OCs mixture. However, *Z. mays* and *P. australis* were able to tolerate OCs mixture concentrations much higher than the environmental detected concentrations.

P. australis plant was able to absorb the OCs (¹⁴C labelled) 1.3 \pm 0.4 % DCB, 5.99 \pm 2 % TCB and 13.91 \pm 5.6 % γ -HCH after 7 days. The underground organs of plants showed the higher bioconcentration. Besides, the OCs transferred within plants – from roots towards the aerial parts- the intensity of this transfer was statistically correlated to the water solubility and the pressure of vapor of every OCs. Consequently, the taken way of transfer seemed to be a xylemian flow based on the transpiration flow and the gaseous flow circulating in aerenchymatic spaces of macrophytes. Further to this transfer, one part of the OCs is phytovolatilised from leaves surfaces (in 28 days: 0.09 % DCB, 0.02 % TCB and 0.03 % γ -HCH).

Enzymatic activities of phase II detoxification (GSTs, UGTs) were studied. A potential induction of the UGTs (leaves) occurred during an exposure to the mixture of the OCs. In the same conditions, GSTs activities were not modified.

This study also demonstrates an adaptation of the rhizospheric bacterial microflora under a gradient of OCs exposures (multi-exposure). The techniques used (16S rRNA, SSCP, 454 pyrosequencing) helped to the detection of strains potentially able to provide OC-rhizodegradation. Such as *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp., recognized for their capacity to degrade certain chlorinated organic pollutants.

Liste des abréviations

CB(s) : Chlorobenzène(s)

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

γHCH : γ-Hexachlorocyclohexane ou Lindane

HAP(s) : hydrocarbure(s) Aromatique(s) Polycyclique(s)

LogK_{oc} : coefficient de partage octanol/carbone organique

LogK_{ow} : coefficient de partage octanol/eau

MCB : Monochlorobenzène

NOEC : No Observed Effect Concentration

OC(s) : Organochloré(s)

PCB(s) : Polychlorobiphényle(s)

PM : Poids Moléculaire

POP(s) : Polluant(s) Organique(s) Persistant(s)

TCB : 1,2,4-Trichlorobenzène

DCB : 1,4-Dichlorobenzène

2,4-D : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

BRGM/RP : Bureau de Recherches Géologiques et Minières / Relation Publique

CEE : Communauté Economique Européenne

CEIP : Centre on Emission Inventories and Projections

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

COST : European Cooperation in Science and Technology

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

EEA : European Environment Agency

EPA : Environmental Protection Agency

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

INRA : Institut national de la recherche agronomique

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

JMPR : Joint Meeting on Pesticide Residues

JO : Journal Officiel

REACH : Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals

RM&C : Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse

UNEP : United Nations Environment Programme

IEM : Interprétation de l'Etats des Milieux

MF : Matière Fraiche

NQE : Normes de Qualité Environnementale

PG : Plan de Gestion

SSFW : Sub Surface Flow Wetland

VLE : Valeur Limites d'Exposition

AOX : Antioxydant

APX : Ascorbate Peroxydase

CAT : Catalase

DHA : Déhydroascorbate

DHAR : Déhydroascorbate Réductase

GPX : glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion

GSSG : glutathion oxydé

GST(s) : Glutathion S-Transférase(s)

GT(s) : GlucosylTransférase(s)

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HO• : radical hydroxyle

HO₂• : l'hydroperoxyde

NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous forme oxydée

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

O₂•⁻ : radical superoxyde

P450(s) : Cytochrome(s) P450

POD : Peroxydases

PrxR : Peroxyrédoxine

ROI(s) : espèces Réactives Oxygénées Intermédiaires

ROS : Reactive Oxygen Species

SOD : superoxydes dismutases

UDP : Uridine Diphosphate

UGT(s) : UDP- GlucosylTransférase(s)

UV : Ultraviolet

PCR : Polymerase Chain Reaction

SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Répartition géographique des consommations en pesticides au niveau européen (European Environment Agency, 2003)

Figure 2 : Carte de la Région Rhône-Alpes représentant (a) la pression phytosanitaire et (b) les zones prioritaires de suivi de la qualité des eaux de surface (DIREN Rhône-Alpes, Révision des zones prioritaires pesticides sur la Région Rhône-Alpes, 2008)

Figure 3 : a. Carte de la Région Rhône-Alpes représentant les zones prioritaires de suivi de la qualité des eaux souterraines et b. Représentation quantitative du groupe d'usage des substances quantifiées dans les eaux souterraines.

Figure 4 : Liste des substances micropolluantes (listes I et II de la DCE 76-464/CEE; DIREN Rhône-Alpes, 2009)

Figure 5 : La Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants (POPs) (ratification par l'Union Européenne le 18 novembre 2004), interdit la production et l'utilisation de 12 POPs « The dirty dozen »

Figure 6 : Estimations préliminaires des quantités de déchets en isomères HCH stockées/déposées dans le monde (Vijgen et al., 2010)

Figure 7 : (A) Estimations des concentrations en γ -HCH dans les sols (ng g^{-1}) (B), dans les eaux de surface ($\mu\text{g l}^{-1}$) et (C) des émissions (tonnes/an) pour l'année 2005 (Vizcaino & Pistocchi, 2010)

Figure 8 : Substances dangereuses retrouvées dans les eaux usées urbaines (Pojer, Agence de l'Eau RM&C, 2008)

Figure 9 : Evaluation de l'état sanitaire des écosystèmes : A. Analyse des perturbations des écosystèmes B. Gestion des écosystèmes (Burger, 2008)

Figure 10 : Techniques de dépollution des sites par lieu de traitement ainsi que les détails des différents procédés (Hyman and Dupont, 2001 ; ADEME, 2009)

Figure 11 : Taux d'utilisation des différentes techniques de traitement des sites pollués en France en 2006 (ADEME, 2009)

Figure 12 : Récapitulatif des différents processus de phytoremédiation décrit par le BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières)

Figure 13 : Consortium eau/complexe argilo-humique/biomasse microbienne (Tissut et al, 2006). Les points représentent les xénobiotiques dans l'écosystème

Figure 14 : Réductions partielles de l' O_2 (Pierre and Fontecave, 1999). (a) Transfert d'électrons et de protons conduisant à la formation du radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), du peroxyde d'hydrogène

(H₂O₂), du radical hydroxyle (HO•) et de l'anion hydroxyle (HO⁻). **(b)** Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle (M : métal)

Figure 15 : Equilibre entre les antioxydants (AOX) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Gill and Tuteja, 2010)

Figure 16 : Voies de gestion des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau des cellules végétales.

Figure 17 : Mécanisme de peroxydation au niveau des parois végétales (Passardi et al., 2004).

Figure 18 : **A.** Schéma du recyclage du GSSG par la glutathion réductase après utilisation du GSH pour la détoxification du H₂O₂ par la glutathion peroxydase. **B.** Glutathion et métabolisme de la plante (Gill and Tuteja, 2010)

Figure 19 : Mécanisme de métabolisation dans la cellule végétale.

Figure 20 : **A.** Induction du stress oxydatif par les xénobiotiques et les rôles protecteurs des glutathion-S-transférases (GSTs).

Figure 21 : **A.** Vue d'ensemble des caractéristiques des différentes classes de GSTs végétales (Edwards and Dixon, 2005).

Figure 22 : Activités (pkat/mg protein) des enzymes O-GT et N-GT avec les substrats indiqués.

Figure 23 : Caractéristiques d'une glycosyltransférase appartenant au clan II. **A :** Diagramme en ruban (structure en 3D) d'une GT adoptant le repli GT-B. Le domaine N-terminal est représenté en orange, le domaine C-terminal en vert. **B :** Réaction catalysée par les GTs. **C :** liste des inversions des replis GT-B, avec structure en cristal disponible. Ceux-ci seront mentionnés dans l'analyse des structures en cristal d'UGT de plante (Osmani et al., 2009)

Figure 24 : Représentation schématique des activités enzymatiques microbiennes de la zone rhizosphérique (Abhilash et al., 2009)

Figure 25 : Représentation des voies de détoxification des xénobiotiques dans un scénario de phytoremédiation.

Figure 26 : Voie de dégradation en aérobie du γ -HCH par *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

Figure 27 : Voie de dégradation du 1,2,4-TCB chez la bactérie *Burkholderia* sp. D'après Guang, 2007

Figure 28 : Voie de dégradation du 1,4-DCB chez la bactérie *Pseudomonas* sp. D'après Jiangbi, 2006

Figure 29 : Voies de dégradation aérobie du MCB par des souches bactériennes (Reineke and Knackmuss 1984 ; Schraa et al 1986 ; Spain and Nishino 1987 ; Haigler et al. 1998 ; Field and Sierra-Alvarez, 2008)

Figure 30 : Schéma de l'organisation classique d'une zone humide à écoulement subsurfacique (SSFW, SubSurface Flow Wetland) d'après Knowles et al, 2011

Figure 31 : Illustration d'un plant de *Zea mays* (Thomé, 1885)

Figure 32 : Illustration de *Phragmites australis* (Thomé, 1885)

Figure 33 : Représentation du stress oxydatif chez les plantes et des paramètres mesurés dans notre étude : (1) Production de H_2O_2 , (2) Activité peroxydases (POD), (3) Activité glutathion réductase

Figure 34 : Schéma expérimental mis en place pour la mise en évidence de la phytotoxicité des OCs sur *Z. mays* et *P. australis*.

Figure 35 : Morphologie des plantes de maïs âgées de 15 jours exposées à une gamme de lindane (0 ; 0,07 et 7 $mg\ l^{-1}$).

Figure 36 : Morphologie des racines de maïs exposées au lindane (7 $mg\ l^{-1}$, 7 jours) : **a.** racines d'une plantule témoin ; **b.** racines d'une plantule traitée

Figure 37 : Morphologie des cellules racinaires de plants de maïs (**a**) témoins et (**b**) exposés au lindane (7 $mg\ l^{-1}$, 7 jours).

Figure 38 : Production de ROS (H_2O_2) dans les racines et feuilles de plants de maïs exposés au lindane.

Figure 39 : Effets du lindane sur les activités POD et GR dans les racines de *Z. mays* pendant 7 jours d'exposition.

Figure 40 : Mise en évidence de la mortalité cellulaires au niveau des racines de *Zea mays* exposées au lindane

Figure 41 : Effets des OCs en mélange sur les parties aériennes des plantes de *P. australis* après 7 jours d'exposition.

Figure 42 : Effets du mélange des OCs sur les activités POD (**a,b,c**) et GR (**d,e,f**) dans les racines (**a,d**), les rhizomes (**b,e**) et les feuilles (**c,f**) de *Phragmites australis* pendant 21 jours d'exposition.

Figure 43 : **a.** Estimation des coefficients de partage avec le carbone organique du sol ($\log K_{oc}$) de chaque OC (Chu and Chan, 2000 ; White, 1992 ; Curl, 1984 ; US EPA, 1996) **b.** Pourcentage de ^{14}C -lindane retrouvé après 7, 14, 21 et 28 jours de traitement (expérience réalisée avec 2g de tourbe dans 50ml d'eau).

Figure 44 : Schéma expérimental pour la mise en évidence de l'absorption des OCs.

Figure 45 : Corrélation entre les valeurs de RCF et $\log K_{ow}$ mesurées dans les racines vivantes et mortes de *P. australis* exposées aux DCB, TCB et γ HCH.

Figure 46 : Comparaison de la structure de l'hypoderme et de l'endoderme des tissus racinaires de *P. australis*.

Figure 47 : Distribution des ^{14}C -OCs (^{14}C -DCB (**A**), ^{14}C -TCB (**B**) et ^{14}C -HCH (**C**)) dans les plantes de *P. australis* pendant 28 jours d'exposition.

Figure 48 : Corrélations entre les ^{14}C -concentrations mesurées dans les racines, les rhizomes et les feuilles de *P. australis* exposées au ^{14}C -DCB (**a,b**), ^{14}C -TCB (**c,d**) et ^{14}C -HCH (**e,f**).

Figure 49 : Corrélation des facteurs de translocation **(A)** et des facteurs de phytovolatilisation **(B)** en fonction de la volatilisation et de la solubilité des OCs testés.

Figure 50 : Circulation gazeuse chez le roseau commun (*P. australis*).

Figure 51 : Schéma expérimentale pour la mise en évidence des activités de détoxification chez la plante.

Figure 52 : Activités UGTs mesurées dans chaque compartiment : racines, rhizomes et feuilles, des plantes de *P. australis* exposées pendant 7 jours au MCB, DCB, TCB et γ HCH en NOEC_{7jours}.

Figure 53 : Activité des UGTs dans les tissus (racines, rhizomes, feuilles) de *P. australis* exposées pendant 7 jours au mélange d'OCs (MCB=0,8 mg l⁻¹; DCB=0,8 mg l⁻¹; TCB=10 mg l⁻¹ et HCH=0,7 mg l⁻¹).

Figure 54 : **A.** Métabolisation du *p.* Chlorophenol observé chez *Tetraselmis marina*. O-GT : O-glucosyltransferase.

Figure 55 : **A.** Schéma récapitulatif du mécanisme de métabolisation dans la cellule végétale à partir d'un organochloré, **B.** Schéma hypothétique de phytodégradation du 1,2,4-TCB par les enzymes de phase I, puis conjugaison du produit formé par les enzymes UGTs (*Tetraselmis marina* par Petroutsos et al., 2007).

Figure 56 : Méthodologies et techniques d'analyses des communautés bactériennes de la rhizosphère.

Figure 57 : Variations du profil moléculaire des communautés fongiques **(a)** et bactériennes **(b)** de la rhizosphère de *Z. mays* en fonction de la durée d'exposition aux OCs (SSCP). Les lignes épaisses indiquent les branches soutenues par une valeur de bootstrap > 500

Figure 58 : Variation du profil moléculaire des communautés bactériennes après 45 jours de traitements, évalués par SSCP. Les lignes épaisses indiquent les branches soutenues par une valeur de bootstrap > 500

Figure 59 : Dendrogramme phylogénétique des bactéries isolées à partir de la rhizosphère de *Z. mays* sans et avec exposition aux OCs. L'arbre phylogénétique a été réalisé à l'aide de la méthode de "neighbor-joining".

Figure 60 : Distribution spatiale et temporelle des principaux MOTUs issus des échantillons de rhizosphères de *Z. mays*. Les colonnes du diagramme représente les 36 MOTUs les plus abondants.

Figure 61 : Distribution spatiale et temporelle des principaux MOTUs issus des échantillons de rhizosphères de *P. australis*. Les colonnes du diagramme représente les 42 plus abondants MOTUs.

Figure 62 : Différents processus de phytoremédiation à partir d'un sol contaminé par des OCs.

Tableaux

Tableau 1 : Structure et propriétés physicochimiques du lindane (γ -HCH)

Tableau 2 : Phrases de risque et conseils de prudence selon l'INRS (γ -HCH)

Tableau 3 : Paramètres physicochimiques de trois chlorobenzènes retrouvés dans l'environnement : le monochlorobenzène (MCB), le 1,4-dichlorobenzène et le 1,2,4-trichlorobenzène (TCB)

Tableau 4 : Exposé des risques et des mesures de sécurité selon l'INRS (2009) concernant les chlorobenzènes.

Tableau 5 : Comparaison des coûts entre les technologies traditionnelles de dépollution et la phytoremédiation (Green and Hoffnagle, 2004).

Tableau 6 : Différents types de traitements en fonction du polluant à extraire ou à traiter (Susarla et al., 1999)

Tableau 7 : Tolérance aux herbicides générée par les P450s, les GSTs ou les GTs (Yuan et al., 2007)

Tableau 8 : Enzymes végétales ayant un rôle dans la transformation de composés organiques

Tableau 9 : Espèces de plantes utilisées dans la phytoremédiation de composés organiques

Tableau 10 : Enzymes de plantes et de la microflore jouant un rôle dans la dégradation de composés organiques.

Tableau 11 : Liste des microorganismes impliqués dans la biodégradation des HCHs (Philips et al, 2005)

Tableau 12 : Détermination des NOEC_{7jours} pour chaque OC testé sur *Z. mays* et *P. australis*.

Tableau 13 : Activités des GSTs mesurées dans les racines, les rhizomes et les feuilles de *P. australis* exposées pendant 7 jours au MCB, DCB, TCB et γ HCH en NOEC_{7jours}.

Tableau 14 : Activités des GSTs mesurées dans les racines, les rhizomes et les feuilles de *P. australis* exposées pendant 7 jours au mélange d'OCs (MCB=0,8 mg l⁻¹; DCB=0,8 mg l⁻¹; TCB=10 mg l⁻¹ et HCH=0,7 mg l⁻¹).

Tableau 15 : Récapitulatif des tests de tolérance sur les souches bactériennes cultivées et issues de la rhizosphère de *Z. mays*.

Tableau 16 : Récapitulatif des tests de tolérance sur les souches bactériennes cultivées et issues de la rhizosphère de *P. australis*.

Introduction

Introduction

1. Contexte général

1.1 Les sources de pollutions issues des activités anthropiques

En Europe, l'activité humaine issue de la révolution industrielle du 19^{ème} siècle ainsi que l'intensification de l'agriculture à hauts rendements dès les années 1950 a été à l'origine des pollutions touchant les compartiments eau, sol et atmosphère. L'origine et la diversité des pollutions étant très étendues, le Conseil sur la Qualité de l'Environnement de la Maison Blanche (1965) définit la pollution comme étant *'une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers des effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux de l'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physicochimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et en produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il possède ou les possibilités récréatives du milieu'*. C'est au cours des années 60s, qu'une prise de conscience de l'ampleur et de la gravité de la pollution de l'écosphère commence à voir le jour, notamment avec des publications d'ouvrages marquant comme le *'Silent spring'* de Rachel Carson (1962). Dans les années 70s, ces préoccupations environnementales conduisent les gouvernements à définir *'une politique dans le domaine de l'environnement'* afin de prendre des mesures pour limiter l'empreinte écologique des populations humaines et pour légiférer les activités humaines contaminantes (Sommet de Paris, 1972).

Au cours de la période 1960-90, l'agriculture a bénéficié d'avancées scientifiques et technologiques permettant une intensification de la production basée sur la mécanisation, l'irrigation et sur l'utilisation de variétés à hauts rendements, d'engrais minéraux et de pesticides¹ (Aubertot et al. 2006). Cette réforme agraire issue d'une volonté politique est appelée *'La Révolution verte'*. Une des conséquences de ce système de production agricole a été l'utilisation progressive d'année en année des pesticides

¹ Pesticide : terme générique qui rassemble les insecticides, les fongicides, les herbicides, les parasitocides

avec un maximum en France de 100 000 T par an dans les années 1995 à 2000. Les premiers pesticides synthétisés et épandus dès les années 30s sont les organochlorés, profitant du développement de la chimie organique de synthèse et de la recherche sur les armes chimiques durant la Première Guerre mondiale. Puis de nombreuses familles chimiques ont été ensuite synthétisées et utilisées avec succès : organophosphorés, triazines, pyréthriinoïdes, carbamates,... Du fait de leur emploi autorisé dans les agrosystèmes, les pesticides, sont évidemment responsables de pollutions diffuses/chroniques et/ou aigües/accidentelles, lors de leur fabrication, transport, utilisation ou lors de leur élimination. Les pays à fortes activités agricoles sont les plus importants consommateurs de pesticides (**Fig 1**) ; en Europe, la France et l'Espagne représentent plus de 40 % de la surface cultivée européenne (<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>, 2001). La France avec près de 4 Kg de pesticides par hectare et par an, représente le premier pays consommateur européen (**Fig 1**, European Environment Agency, 2003), ce qui représente 33 % de l'utilisation européenne annuelle en pesticides (actuellement autour de 75 000 T par an).

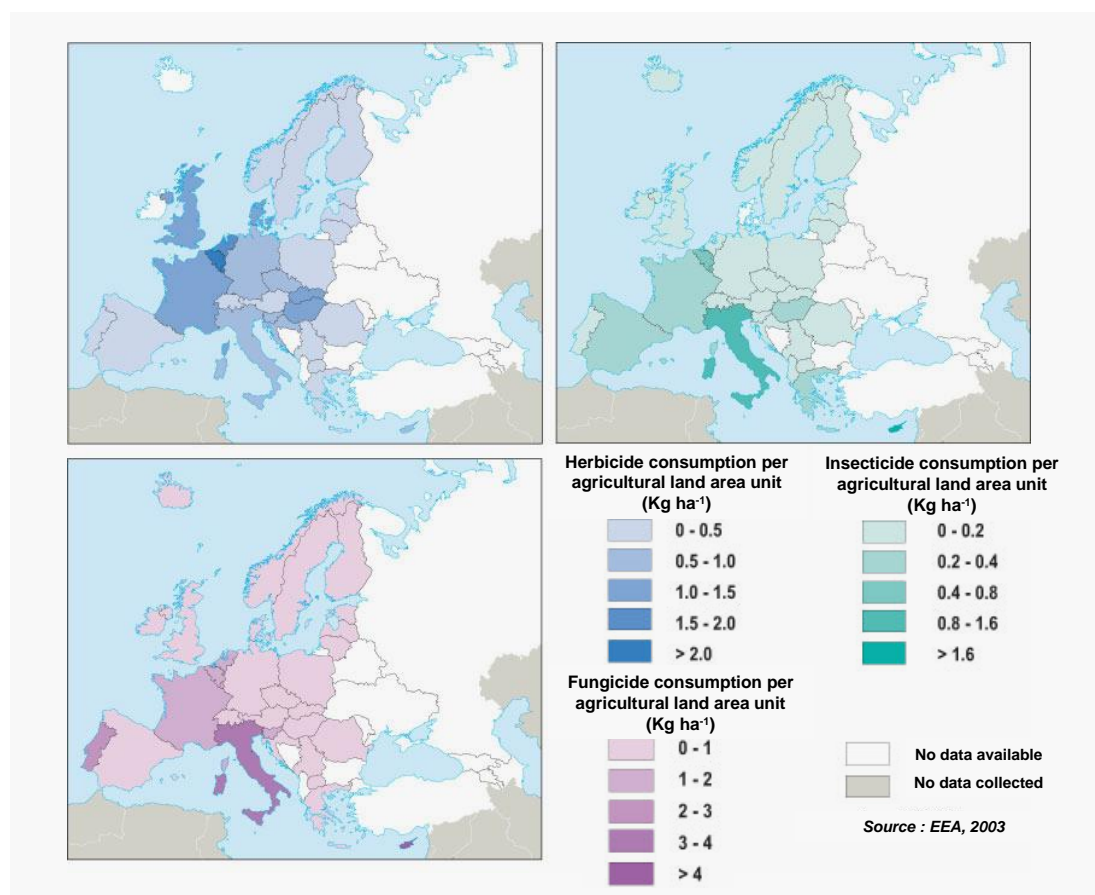


Figure 1 : Répartition géographique des consommations en pesticides au niveau européen (European Environment Agency, 2003).

En Rhône-Alpes, la production agricole représente un rendement annuel moyen d'environ 4 milliards d'euros, ce qui correspond à 5% de la production nationale (Chambre régionale d'agriculture Rhône-Alpes, 2005). Les quatre filières les plus importantes sont le lait (619 millions d'euros), le vin (420 millions d'euros), la viande bovine (390 millions d'euros) et les céréales (355 millions d'euros). Cette activité agricole s'accompagne d'un risque environnemental lié à l'utilisation des pesticides dont la pression phytosanitaire est essentiellement localisée dans la vallée du Rhône (**Fig 2a**). Par conséquent, des zones prioritaires vis-à-vis du risque environnemental de contamination par les pesticides des eaux de surface (**Fig 2b**) et souterraines (**Fig 3a**) ont été diagnostiquées par les services publics. Les pesticides retrouvés dans les eaux souterraines sont majoritairement représentés par les herbicides (62%) puis plus modestement par les fongicides (7%), les insecticides (4%) et un mélange de métabolites issues des molécules mères de l'ordre de 24% (**Fig 3b**).

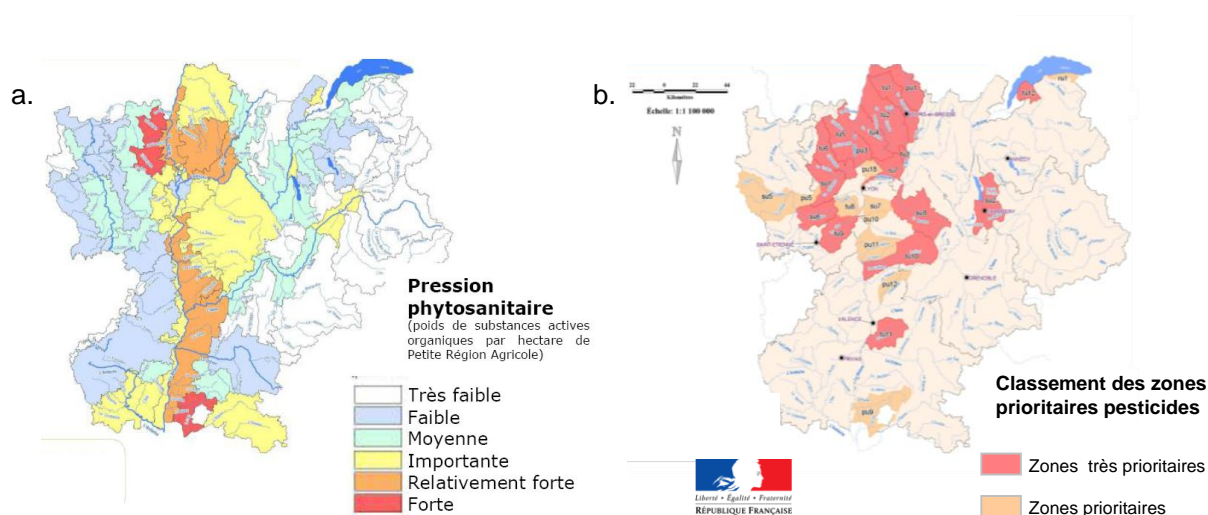


Figure 2 : Carte de la Région Rhône-Alpes représentant (a) la pression phytosanitaire et (b) les zones prioritaires de suivi de la qualité des eaux de surface (DIREN Rhône-Alpes, Révision des zones prioritaires pesticides sur la Région Rhône-Alpes, 2008).

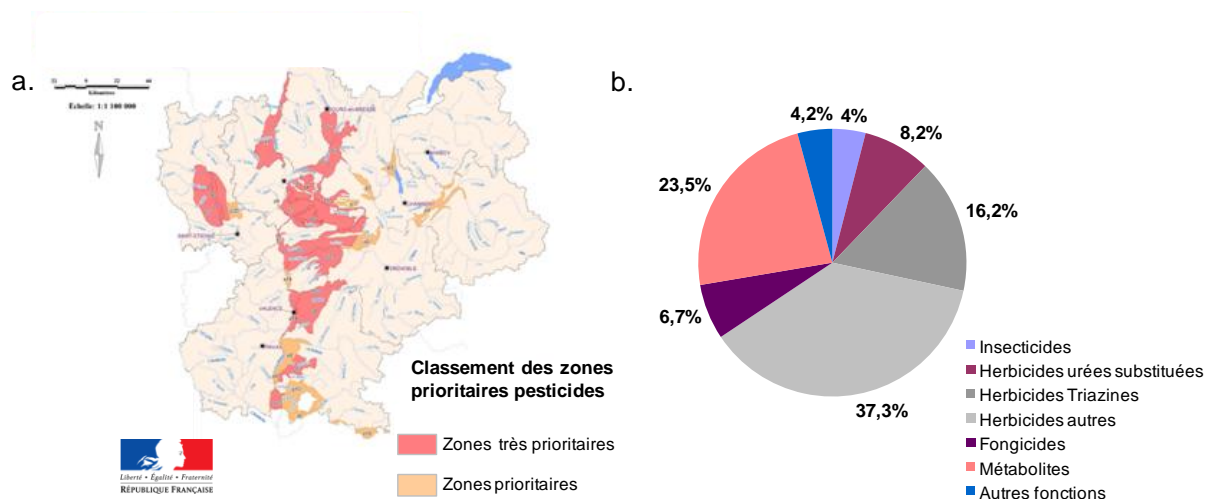


Figure 3 : a. Carte de la Région Rhône-Alpes représentant les zones prioritaires de suivi de la qualité des eaux souterraines et b. Représentation quantitative du groupe d'usage des substances quantifiées dans les eaux souterraines : « *Etat des lieux sur les pesticides dans la région Rhône-Alpes en 2003* » (DIREN Rhône-Alpes, 2003 et 2008)

1.2 Le renforcement des mesures règlementaires et législatives européennes

Sous la pression d'une société de consommation qui s'interroge sur les conséquences éventuelles de telles pollutions sur la santé et sur l'environnement, les autorités politiques se positionnent au niveau législatif, particulièrement en Europe, depuis plus de 40 ans, en obligeant à la mise en œuvre de directives de plus en plus contraignantes pour les secteurs concernés. C'est en octobre 1972 que le sommet de Paris traite pour la première fois des questions environnementales en initiant la lutte contre la pollution au plan communautaire. La protection des eaux y représentait un thème important. Des normes de contamination sont alors établies dans les secteurs de l'eau, de l'alimentation et plus récemment, concernant l'état écologique des milieux naturels. Les principaux textes en vigueur sont :

- **la Directive CEE 80-778 du 15 juillet 1980** relative à la qualité de l'eau potable, fixant à $0,1\mu\text{g l}^{-1}$ la teneur en chaque pesticide, et $0,5\mu\text{g l}^{-1}$ maximum, toutes molécules actives confondues, pour l'eau potable.

- **la Directive 91/414/CEE du 15 juillet 1991** relative à l'autorisation de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et qui vise à la réévaluation des normes toxicologiques et écotoxicologiques pour l'homologation des nouvelles molécules, et à la programmation de la ré-homologation des anciennes molécules.

- **la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE)** du 23 octobre 2000, obligeant les Etats-membres d'atteindre en 2015 un "bon état" chimique et écologique de leurs "masses d'eau" superficielles, et un "bon état" chimique des masses d'eau souterraines.

Sans oublier le texte concernant la loi **REACH** (**R**egistration, **E**valuation and **A**utorisation of **C**hemicals) qui a été soumis à un vote au Parlement Européen le 14 novembre 2005, et qui vise à mettre en place, sur onze ans, un système d'enregistrement de 30 000 substances chimiques produites ou importées dans l'Union européenne. La nouveauté de ce projet de loi étant celui d'obliger les industriels et non plus les autorités publiques, à prouver que les risques sur la santé humaine et sur l'environnement liés à leurs activités sont limités.

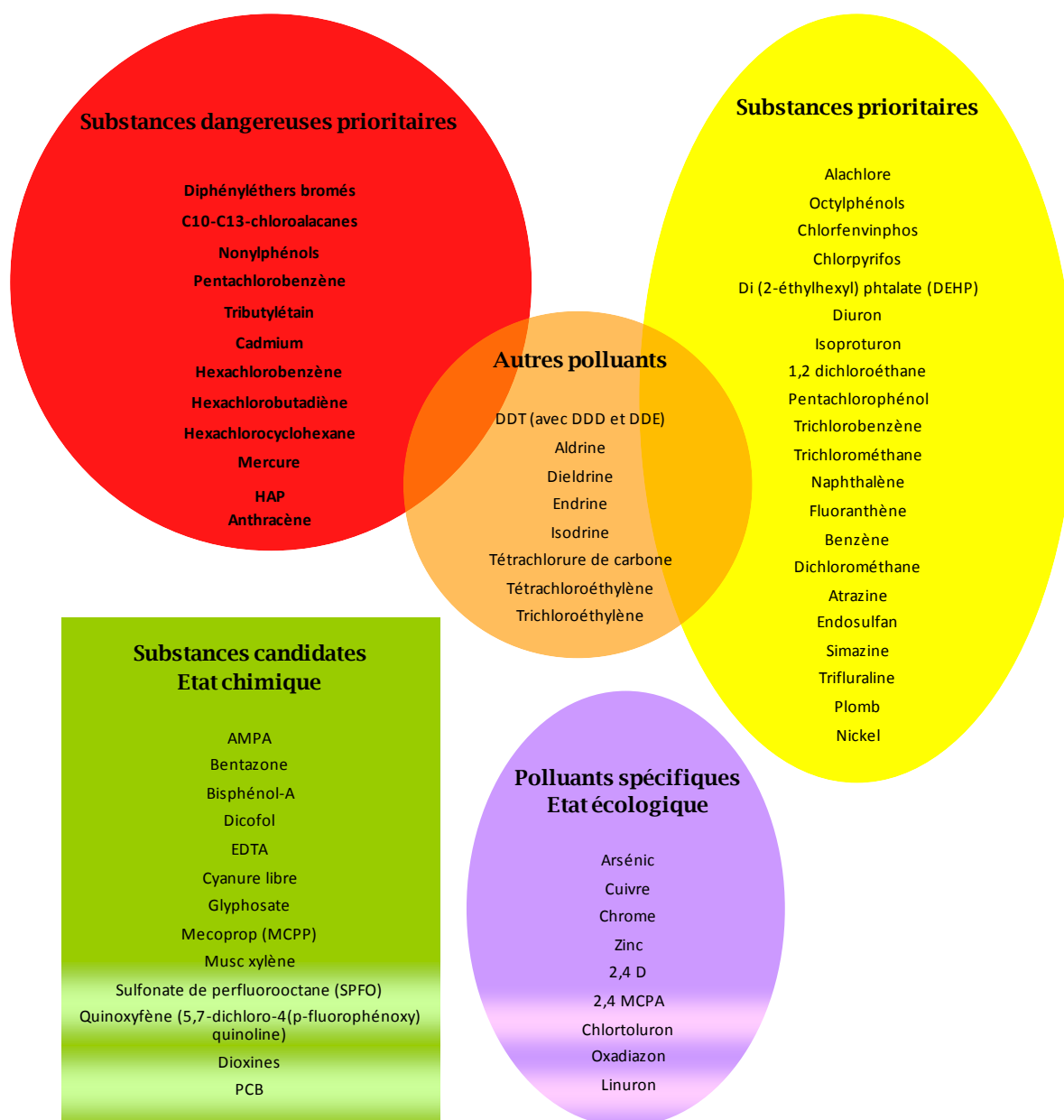


Figure 4 : Liste des substances micropolluantes (listes I et II de la DCE 76-464/CEE; DIREN Rhône-Alpes, 2009)

La Directive 76-464/CEE du 4 mai 1976 concernant la pollution provoquée par le déversement de substances dangereuses dans les milieux aquatiques ainsi que la DCE ayant pour objectif majeur « le bon état des eaux » d'ici 2015 et la non dégradation des écosystèmes, ont établi une liste des substances micropolluantes par ordre de priorité d'étude (**Fig 4**). Les substances ainsi identifiées ont été répertoriées dans différents groupes, suivant leur dangerosité sur les écosystèmes et la santé humaine, (1) les substances dites prioritaires, pour lesquelles des **NQE** (**N**ormes de **Q**ualité **E**nvironnementale) et des **VLE** (**V**aleur **L**imites d'**E**xposition) sont fixées, afin de réduire

les rejets dans la nature, (2) les substances dites dangereuses prioritaires, pour lesquelles des NQE sont fixées et les rejets strictement interdits et enfin, (3) d'autres polluants également, appartenant aux listes I et II pour lesquels un programme national de réduction est mis en place afin de les éliminer des écosystèmes aquatiques et de limiter leur rejets.

Parmi les substances indiquées dans la **figure 4**, les molécules chlorées représentent 50% des substances, dont 30% correspondent à des pesticides. Parmi les pesticides listés, le DDT, la dieldrine, le lindane sont des insecticides organochlorés. Cependant, leur forte rémanence dans les écosystèmes, leur fort potentiel de bioaccumulation et bioamplification et leurs impacts toxicologiques sur les organismes en font des substances d'ordre sanitaire prioritaires (Breivik and Wania 2003).

2. Les organochlorés (OCs)

2.1 Définition et Historique des OCs

Les organochlorés (OCs) sont des composés organiques, obtenus par chloration de différents hydrocarbures insaturés. Ils se caractérisent par une faible solubilité dans l'eau, une forte résistance à la dégradation biologique, chimique et photolytique (Simonich and Hites 1995, Willett et al. 1998).

Dans les années 1930, une forte demande de l'agriculture et de l'industrie électrique vers l'industrie chimique, fait apparaître la commercialisation des premiers composés OCs (DDT=Dichlorodiphényltrichloroéthane, PCBs=Polychlorobiphényles). Depuis les OCs ont vu leur utilisation augmenter et se développer de façon importante et large, comme isolants thermiques et électriques (PCBs), comme insecticides en agriculture ou domestiques (DDT, HCH, chlordane, aldrine, dieldrine, mirex, ou toxaphène), comme fongicides (HCH) ou comme ignifuges (mirex). Ces pesticides OCs utilisés au niveau mondial de façon intensive (production en milliards de tonnes au cours du 20^{ème} siècle) ont conduit à l'apparition de résistances en particulier chez des insectes. Ces observations entraînèrent une utilisation des pesticides encore plus massive, dans le but d'optimiser leurs applications (Regnault-Roger et al. 2004).

Au début des années 60s, de nombreuses recherches ont démontré les effets négatifs de ces substances sur différents organismes vivants ainsi qu'une forte persistance dans l'environnement notamment dans les sols et les sédiments, et une possible bioamplification dans les chaînes trophiques (Duggan et al. 1966, Nash and Woolson 1967). Pour ces raisons, des lois ont été votées et dans les années 1970 de nombreux pays ont décidé d'interdire la synthèse et l'utilisation du DDT et en 1998 celle du lindane ainsi que d'autres pesticides organochlorés à cause de leur rémanence et de leur toxicité (Duggan et al. 1966, Nash and Woolson 1967). En 1971 les Etats Unis et en 1978 le Canada, ont interdit l'usage de ces produits et mélanges (Barrie et al. 1992). Cependant, malgré ces interdictions, la Chine, l'Inde et l'Union Soviétique sont restés les plus grands producteurs et utilisateurs de ces produits jusqu'aux années 80-90 (Walker et al. 1999). La Chine abandonna le HCH technique et le lindane en 1983 et l'Union Soviétique en 1990 (Li 1999), mais ces pays ainsi que le Srilanka et l'Indonésie ont autorisé l'emploi jusqu'à épuisement des stocks.

En 2001 la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, visant à faire établir des lois internationales, lance une campagne mondiale sur l'élimination de 12 polluants chimiques dangereux (**Fig 5**). Parmi ces 12 produits, 8 sont des pesticides répertoriés dont le chlordane, l'aldrine, la dieldrine, l'endrine, l'heptachlore, le toxaphène, le mirex et le DDT reconnus pour être persistants et pouvant être bioamplifiés dans les chaînes trophiques ; les produits chimiques industriels regroupant les PCBs et l'hexachlorobenzène (HCB) et enfin les sous-produits de combustion comme les dioxines et les furanes.

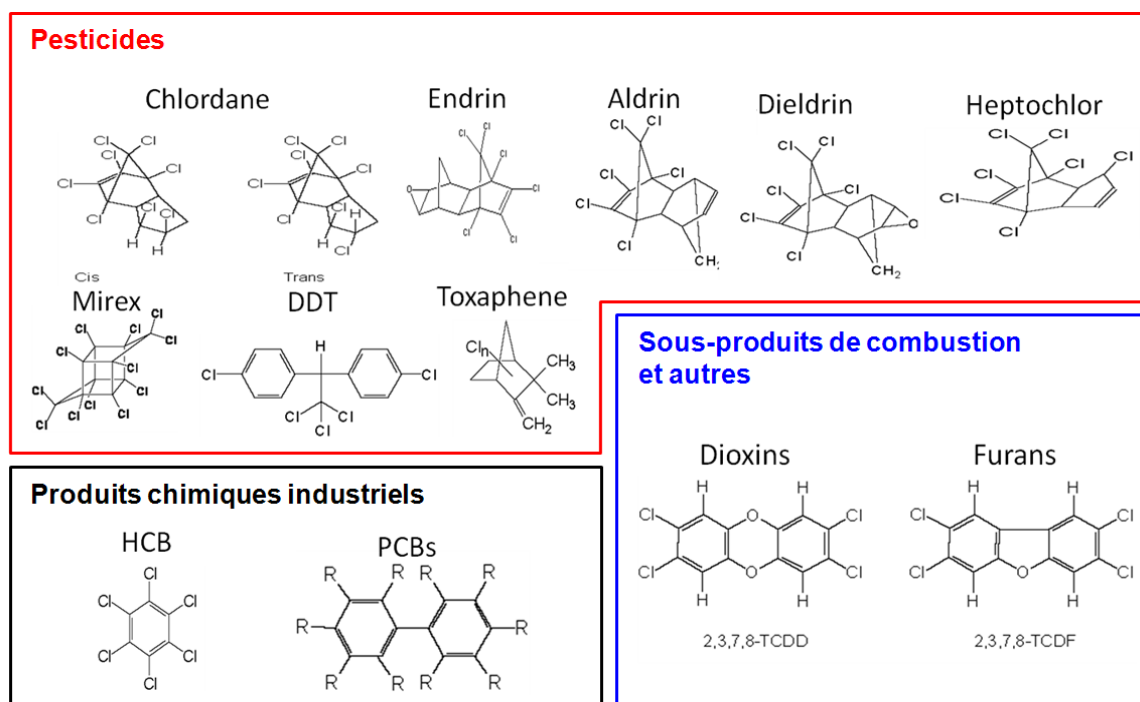


Figure 5 : La Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants (POPs) (ratification par l'Union Européenne le 18 novembre 2004), interdit la production et l'utilisation de 12 POPs « The dirty dozen ».

En 2003 d'autres études de Dutta et Schafer montrèrent que le lindane était toujours produit en Inde et en Roumanie. En Afrique, d'importants stocks de lindane existent toujours pouvant également induire des incidences sur l'environnement même si son utilisation a été interdite (UNEP de Genève, 2007).

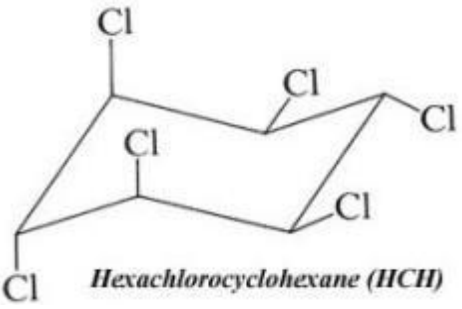
Plus récemment, en 2008, la Convention COP4 (UNEP 2009) liste le lindane dans l'Annexe A de la Convention avec une dérogation spécifique pour son usage pharmaceutique contre les poux et la gale (UNEP 2009). Cet amendement de la Convention a pris effet le 26 octobre 2010. Par conséquent, la production et la vente de lindane sont encore possible pour des utilisations précises.

2.2 Le Lindane (γ -HCH)

Le lindane ou γ -HCH [gamma -1,2,3,4,5,6 - hexachlorocyclohexane (**Tableau 1**)] synthétisé pour la première fois en 1825 par Michael Faraday par photochlorination du benzène (Metcalf 1955), est un insecticide neurotoxique de la famille des organochlorés le plus produit et utilisé après la seconde guerre mondiale jusqu'aux années 1990 (Breivik et al. 1999). Son mode d'action se définit par une interaction avec le récepteur GABA des canaux chlorure en agissant par contact, ingestion et inhalation sur le système

nerveux central d'une large communauté d'insectes (Budavari 1989). Son faible coût de production et ses propriétés toxiques lui ont valu d'être utilisé dans de nombreuses applications agricoles : comme fongicide contre la carie du blé, orge, avoine, seigle etc.. (Bailey 1998, Barber et al. 2005), comme insecticide en traitement de sols (maïs, betteraves ...), en traitement de semences (céréales, colza, lin, ...), en traitement foliaire (arboriculture, cultures maraîchères, ornementales et fourragères) ; en application vétérinaire comme scabicide pour le traitement antiparasitaire des animaux (gales, tiques, puces, poux) et en médecine humaine pour le traitement de la gale (Index phytosanitaire ACTA, 1998). En usage militaire par exemple, il était directement appliqué sur la peau des hommes et sur les vêtements pour lutter contre la gale et les poux. En 1983, le US EPA (US Environmental Protection Agency) a interdit l'usage d'antiparasitaires contenant du lindane. D'autres applications du lindane visaient également à la protection des bois d'œuvre (grumes, charpentes, meubles) contre les « ravageurs » du bois.

Tableau 1 : Structure et propriétés physicochimiques du lindane (γ HCH)

 <p>Hexachlorocyclohexane (HCH)</p>	<table> <tr> <td>Poids moléculaire (g mol^{-1})</td><td>290,84</td></tr> <tr> <td>Log Kow</td><td>3,7</td></tr> <tr> <td>Log Koc</td><td>3-3,57</td></tr> <tr> <td>Limite de solubilité (mg l^{-1})</td><td>7</td></tr> <tr> <td>Tension de vapeur (Pa)</td><td>$1,25 \cdot 10^{-3}$</td></tr> <tr> <td>Constante de Henry kH ($\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$)</td><td>0,355</td></tr> </table>	Poids moléculaire (g mol^{-1})	290,84	Log Kow	3,7	Log Koc	3-3,57	Limite de solubilité (mg l^{-1})	7	Tension de vapeur (Pa)	$1,25 \cdot 10^{-3}$	Constante de Henry kH ($\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$)	0,355
Poids moléculaire (g mol^{-1})	290,84												
Log Kow	3,7												
Log Koc	3-3,57												
Limite de solubilité (mg l^{-1})	7												
Tension de vapeur (Pa)	$1,25 \cdot 10^{-3}$												
Constante de Henry kH ($\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$)	0,355												

C'est une molécule très lipophile et chimiquement stable avec un $\log K_{ow}$ de 3,7 et une limite de solubilité dans l'eau de 7 mg l^{-1} (Tomlin 1994). Dans l'environnement, le temps de demi-vie du γ HCH peut varier de quelques jours à plusieurs années selon la nature du sol, le climat, le pH etc... Dans les sols agricoles européens, sa demi-vie est de 40 à 70 jours (OMS IPCS 1991) et aux pH environnementaux, son hydrolyse peut être lente ($t_{1/2}$ allant de 4 jours (pH9, 25°C) à 42 ans (pH8, 5°C)) (Roberts 1998, Webster et al. 1998).

L'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) a listé les risques et les mesures de

sécurité à prendre en cas d'utilisation ou d'exposition au lindane, l'estimant comme toxique pour la santé humaine et animale, ainsi que pour l'environnement (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Phrases de risque et conseils de prudence selon l'INRS (γHCH)

Exposé des risques et mesures de sécurité
R23/24/25 Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion
R36/38 Irritant pour les yeux et la peau
R50/53 Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique
S2 Conserver hors de portée des enfants
S13 Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour les animaux
S44 En cas de malaise, consulter un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)
200-401-2 Etiquetage CE

D'après le CIRC (Centre International de Recherche contre le Cancer) en 1987, le lindane est classé comme étant un cancérigène possible pour l'homme, cependant le Comité mixte sur les résidus de pesticides (JMPR) a également conclu en 2004 que «*En l'absence de génotoxicité et sur la base des preuves apportées par les études de cancérogénicité, le lindane n'est pas de nature à représenter un risque cancérogène pour l'homme.* ». De par la forte persistance de cette molécule dans les écosystèmes et de par son caractère toxique et écotoxicologique, le lindane a été interdit d'utilisation en France depuis le 1^{er} juillet 1998 (**JO du 15/02/1997**) et dans cinquante autres pays.

Les dernières estimations des quantités de déchets isomères HCH déposés dans le monde, ont fait l'objet d'études préliminaires et ont donné lieu à des résultats allant de 4 à 7 millions de tonnes produits et rejetés dans l'environnement, sur une période d'utilisation de 60 ans (Courdouan et al. 2004, Vijgen et al. 2010). En tenant compte des données historiques des pays producteurs de HCH/lindane et les estimations provisoires des quantités de déchets déversés dans l'environnement, une représentation de leur répartition dans le monde a été réalisée (**Fig 6**). L'Europe semble être le plus important détenteur de déchets en isomères HCH dans le monde (estimation d'environ 1,3 millions de tonnes).

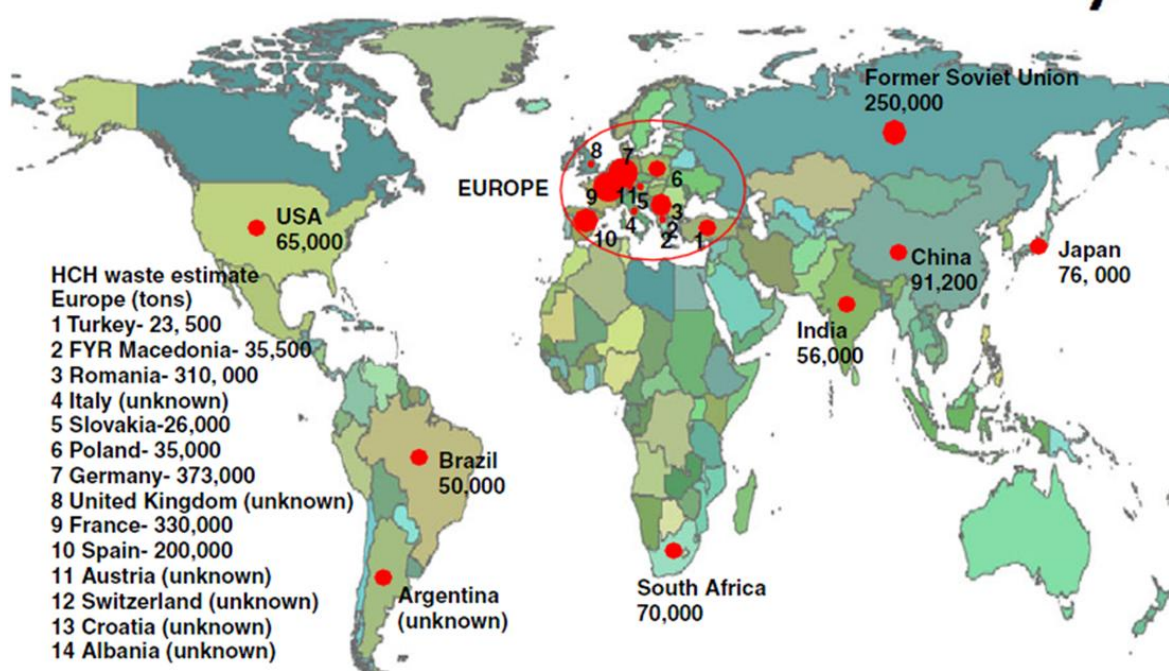


Figure 6 : Estimations préliminaires des quantités de déchets en isomères HCH stockées/déposées dans le monde (Vijgen et al. 2010)

En Europe, le devenir du lindane a été intensément étudié afin d'évaluer les émissions, de collecter des données de surveillance (CEIP, 2009 Centre on Emission Inventories and Projections) et d'établir des modèles de sa distribution dans les différents compartiments de l'écosphère. En 2009, le total des émissions européennes en lindane avait significativement diminué depuis l'interdiction d'utilisation et la France est responsable de la moitié de ces teneurs atmosphériques. Plusieurs modèles ont été développés pour décrire le comportement environnemental du lindane dans des matrices variées comme les sols, les eaux et l'atmosphère (Breivik and Wania 2002, Zukowska et al. 2005, Ilyina et al. 2006). Ces études de monitoring ont permis d'établir des cartes de répartition des résidus de lindane dans les sols, les eaux de surfaces et dans l'atmosphère (**Fig 7**). Ces estimations tiennent compte essentiellement des anciennes activités agricoles intensives, qui se répartissent principalement dans le Nord de la France et dans le Sud de l'Angleterre, avec des doses supérieures à $0,01\text{ng g}^{-1}$ de sol (**Fig 7A**). La persistance du lindane au niveau des sols peut s'expliquer par sa forte adsorption aux complexes argilo-humiques ($\text{Log}K_{oc} = 3-3,57$) (Lyman et al. 1982). Les résidus liés représentent plus de 75% des résidus HCH retrouvés dans les sols contaminés (Agnihotri et al. 1994). Cependant, même si la mobilisation par lessivage

dans le sol du lindane reste faible (potentialité de pollution diffuse des eaux souterraines (OMS IPCS 1991, Extoxnet 1996, ATSDR 1994), le lindane peut être dispersé par l'érosion éolienne et hydrique des sols (Willett et al. 1998). Dans les eaux de surface (**Fig 7B**), le lindane se retrouve encore en forte concentration sur le territoire français, avec des teneurs s'élevant à plus de $0,001\mu\text{g l}^{-1}$. En comparant ces résultats avec ceux obtenus sur les émissions de lindane en tonnes par an dans l'atmosphère (**Fig 7C**), il s'avère que les pays les plus concernés restent la France d'une part mais également les pays voisins tels que l'Allemagne, l'Espagne ou l'Angleterre avec des valeurs atmosphériques atteignant jusqu'à plus de 1 tonne par an. D'après ces données, le lindane peut également être véhiculé par les voies atmosphériques et gagner ainsi des territoires jusqu'ici non contaminés.

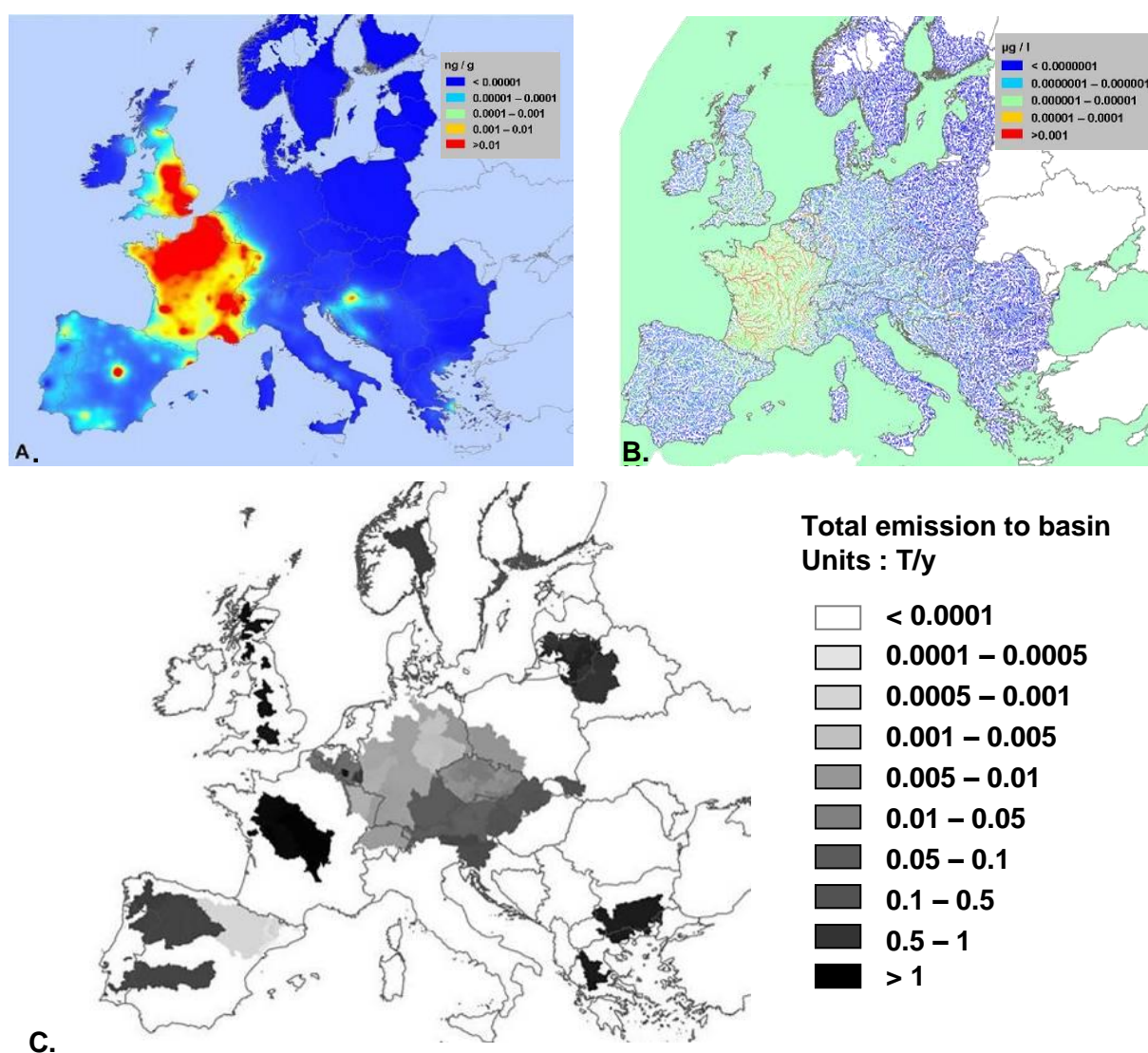


Figure 7 : (A) Estimations des concentrations en γ -HCH dans les sols (ng g^{-1}) (B), dans les eaux de surface ($\mu\text{g l}^{-1}$) et (C) des émissions (tonnes/an) pour l'année 2005 (Vizcaino and Pistocchi 2010)

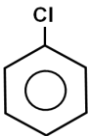
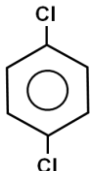
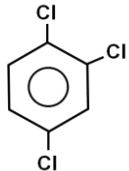
Ces estimations sont corroborées par des analyses chimiques réalisées sur des échantillons prélevés *in situ*. Les isomères totaux du HCH ont été détectés dans les sols de l'ordre de 4 à 125 280 mg kg^{-1} . Les secteurs les plus contaminés correspondent à d'anciens sites d'évacuation de déchets industriels et à des sols agricoles (Miglioranza et al. 2003, Abhilash and Singh 2009). Au fil du temps et des apports en eaux, les isomères HCH présents dans les sols ont pu être lessivés entraînant une contamination chronique des eaux souterraines, par exemple le niveau de contamination des nappes a pu atteindre 730 $\mu\text{g l}^{-1}$ à l'emplacement d'un ancien site industriel en Allemagne (Ricking and Schwarzbauer 2008). Les niveaux de contamination environnementale sont

variables de l'ordre de 0,41 à 2,8 ng l⁻¹ pour les eaux de surface (Marvin et al. 2004) et de l'ordre de 1,95 à 11,05 ng g⁻¹ dans les sédiments des rivières (Sun et al. 2010, Turgut et al. 2010) jusqu'à 396 ng g⁻¹ dans les zones voisines de sites industriels (Ricking and Schwarzbauer 2008).

2.3 Les chlorobenzènes (CBs)

Les chlorobenzènes sont des composés aromatiques halogénés monocycliques sur lesquels un ou plusieurs des atomes d'hydrogène du noyau benzénique est substitué par un atome de chlore. Les chlorobenzènes sont des molécules principalement utilisées en tant qu'intermédiaires de synthèse de solvants, d'herbicides, de peintures et d'autres produits chimiques. Ils sont rejetés dans l'environnement par le biais de ces utilisations et lors de l'élimination de produits chlorés, issus entre autres, des incinérateurs ou des sites de déchets toxiques (Malcolm 2004, Guerin 2008).

Tableau 3 : Paramètres physicochimiques de trois chlorobenzènes retrouvés dans l'environnement : le monochlorobenzène (MCB), le 1,4-dichlorobenzène et le 1,2,4-trichlorobenzène (TCB) (HSDB 2000, Howard 1989, ATSDR 1993, Verschueren 1996)

	MCB	1,4-DCB	1,2,4-TCB
Formule			
Poids moléculaire (g mol ⁻¹)	112,56	147,01	181,45
Log <i>k_{ow}</i>	2,85	3,42	4,05
Log <i>K_{oc}</i>	2,35	2,4-3,3	3,3-3,5
Limite de solubilité dans l'eau (mg l ⁻¹)	442	80	40
Tension de vapeur (Pa)	1580	162	44-46
Constante de Henry <i>k_H</i> (Pa m ³ mol ⁻¹)	345-315	152-294	101-144

Les CBs sont régulièrement détectés dans l'atmosphère (Popp et al. 2000, Malcolm 2004) car ils présentent une tension de vapeur relativement élevée caractéristique des molécules volatiles (**Tableau 3**). Par ailleurs, ils sont couramment détectés dans les eaux de rivières (Meharg et al. 2000), les sédiments (Lee et al. 2000) et les boues d'épuration (Wang and Jones 1994c). Possédant une lipophilie relativement forte, les chlorobenzènes sont assez bien retenus dans le sol au niveau du complexe argilo-humique et seule une faible part peut s'infiltrer en profondeur jusqu'aux nappes phréatiques (Garrison 1969).

L'agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse (RM&C) a pu mettre en évidence dans les eaux de sortie de station d'épuration, des teneurs élevées en substances dites dangereuses (**Fig 8**) de l'ordre de 1 kg j^{-1} dans la région lyonnaise. Parmi ces substances sont retrouvés le monochlorobenzène (30 kg j^{-1}), le 1,2,4-trichlorobenzène (5 kg j^{-1}) ainsi que le 1,4-dichlorobenzène ($>1 \text{ kg j}^{-1}$). Ces valeurs nous renseignent et mettent en évidence une persistance avérée de ces produits chlorés. Retrouvés régulièrement dans l'environnement, et dans le cas présent dans les eaux, ils semblent pouvoir jouer un rôle non négligeable dans le déséquilibre des écosystèmes aquatiques.

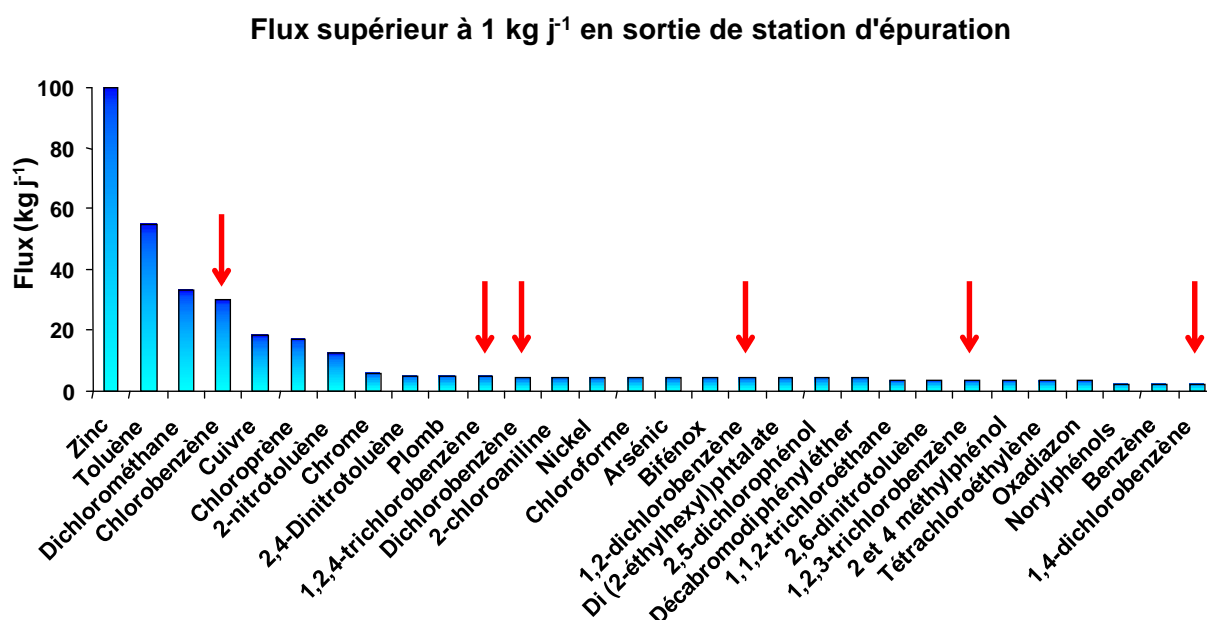


Figure 8 : Substances dangereuses retrouvées dans les eaux usées urbaines (Pojer, Agence de l'Eau RM&C, 2008)

Dans la littérature, les CBs sont décrits comme des polluants communément détectés dont les concentrations environnementales sont variables, par exemple 0,07 à 34,79 ng l⁻¹ pour les eaux de drainage de sites industriels (Meharg et al. 2000) ou 89,9 à 6 638 ng l⁻¹ pour les eaux urbaines chinoises (Zhou et al. 2009), 0,4 à 5,8 µg g⁻¹ dans les sédiments (Lee et al. 2000) et 3,98 à 71,3 µg g⁻¹ dans les boues d'épuration (Wang and Jones 1994d). Ces composés sont plutôt lipophiles ($2,85 < \log K_{ow} < 4,05$ **Tableau 3**), par conséquent ils présentent un potentiel de bioaccumulation dans les organismes (Malcolm 2004).

Le monochlorobenzène (MCB) est une molécule hautement volatile (OMS IPCS 1991, IUCLID 1996, Kirk Othmer 1983, Prager 1995, STF 1991, Ullmann 1986). Le MCB est utilisé comme solvant dans les peintures, teintures, adhésifs, cires, produits pharmaceutiques, pour les di-isocyanates et le caoutchouc naturel. Il est d'autre part utilisé comme intermédiaire dans la fabrication du phénol et de composés organiques halogénés notamment pesticides et insecticides, et employé comme fluide diélectrique et fluide de transfert de chaleur (source INERIS, 2005).

Le 1,4-dichlorobenzène (DCB) avec une pression de vapeur de 162 Pa à 25°C et un kH entre 152 et 294, ce trouve être également très volatile. Le DCB est en grande partie employé dans la fabrication du 1,4-dichloro-2-nitrobenzène utilisé dans les teintures et les pigments, mais il entre également dans la composition de solvants organiques, d'herbicides, d'insecticides (larvicide), de conservateurs de bois (ATSDR 1993, Howard 1989, HSDB 2000, Verschueren 1996), dans la composition de répulsifs contre les mites et de désodorisants d'air ambiant, en particulier les blocs désodorisants utilisés dans les toilettes. Pour cette dernière application, son efficacité provient de sa forte odeur et de sa tension de vapeur élevée (source INERIS, 2006).

Le 1,2,4-trichlorobenzène (TCB) se caractérisant par une limite de solubilité de 40mg/l et une tension de vapeur de 44-46 Pa à 25°C, constituent un gros problème de pollution issue d'anciennes industries textiles par exemple, ainsi que des vieux transformateurs contenant encore des produits toxiques (Environmental Protection Agency, 1976). Le TCB entrant également dans la composition d'insecticides, de produits de nettoyage pour fosses septiques ou égouts et de produits de préservation du bois, il peut être libéré au cours de la combustion de polymères chlorés ainsi que de la production et de l'utilisation de monochlorobenzène.

Tableau 4 : Exposé des risques et des mesures de sécurité selon l'INRS (2009) concernant les chlorobenzènes : MCB=monochlorobenzène ; DCB=1,4-dichlorobenzène et TCB=1,2,4-trichlorobenzène

Exposé des risques et mesures de sécurité								
	MCB	DCB	TCB		MCB	DCB	TCB	
R10 Inflammable	+	-	-	S2 Conserver hors de porté des enfants	+	+	+	
R20 Nocif en cas d'inhalation	+	-	-	S23 Ne pas respirer les gaz	-	-	+	
R22 Nocif en cas d'ingestion	-	-	+	S24/25 Eviter le contact avec les yeux et la peau	+	-	-	
R36 Irritant pour les yeux	+	+	-	S36/37 Porter des vêtements de protection et des gants	-	+	+	
R38 Irritant pour la peau	+	-	+	S37/39 Porter des gants et des lunettes de protection	-	+	+	
R40 Effets cancérigènes suspectés	-	+	-	S60 Eliminer comme déchets dangereux	-	+	+	
R50/53 Très toxique pour les organismes aquatiques	-	+	-	S61 Eviter le rejet dans l'environnement	+	+	+	

L'INRS a exposé les risques et les mesures de sécurité à prendre en cas d'utilisation ou d'exposition au MCB, DCB et TCB (**Tableau 4**), les estimant comme toxiques pour la santé, ainsi que pour l'environnement, avec des effets cancérigènes suspectés.

3. Les moyens de lutte contre cette pollution

3.1 Analyse de l'état d'un écosystème

Les mesures de gestion d'un site pollué doit se concevoir en intégrant les stratégies suivantes (**Fig 9**) (Nathanail et al. 2002):

- la maîtrise de la source de pollution par le déploiement de travaux de réhabilitation (enlèvement / destruction total ou partiel de la source),
- en limitant les transferts de pollution qui demandent une analyse des techniques à utiliser, du coût et des bénéfices,
- une modification des aménagements par changement des usages sur et hors site (adaptation de l'espace projet aux contraintes et pollutions résiduelles du site ...) et par le contrôle des activités (sources d'allumage...).

Pour réaliser une gestion optimale de la zone polluée, certaines étapes décisionnelles sont essentielles dans le processus d'élaboration d'un plan d'action. Ces stratégies d'appréhension de la problématique environnementale sont résumées dans la **Figure 9**. La première étape correspond à l'évaluation de l'état sanitaire de la zone ce qui sous-entend une analyse précise de la pollution (nature chimique, niveau de contamination, localisation,...), une évaluation des effets toxiques (aigües, comportementaux, épidémiologiques,...) et une analyse des perturbations écologiques (fonctionnalité sur site et avec les autres zones juxtaposées, perturbations trophiques,...) (**Fig 9A**). Cette première analyse des perturbations environnementales permet d'ouvrir une discussion avec les gestionnaires des écosystèmes afin d'appliquer des méthodes de dépollution adaptées. L'utilisation d'une technique plutôt qu'une autre dépend de plusieurs critères : technologiques, organisationnels, économiques, environnementaux et sociopolitiques (Edwards 2005). L'étape suivante consiste à travailler sur une gestion des écosystèmes par des étapes successives permettant la mise en place des systèmes de remédiation/restauration sélectionnés et de la gestion à long terme (**Fig 9B**). Après la mise en place de solutions curatives, la gestion du système reste sous surveillance étroite avec les gestionnaires qui suivent les paramètres chimiques, biologiques et

écologiques afin d'évaluer la 'santé du système' avant, pendant et après le traitement de la pollution. La surveillance du système permettra d'adapter les modes de gestion en fonction de la réponse du système. En France, l'arrêté datant du 08/02/2007 du Ministère de l'Environnement permet la mise en place de deux modes de gestion de la pollution des sols, (1) la démarche d'Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM), qui permet de s'assurer que l'état du milieu considéré est compatible avec des usages présents déjà fixés et (2) le Plan de Gestion (PG), qui permet, en fonction de la situation, d'agir aussi bien sur l'état du site (par des aménagements ou des mesures de dépollution) que sur les usages qui peuvent être choisis ou adaptés (BRGM/RP - 58609 – FR Juin 2010).

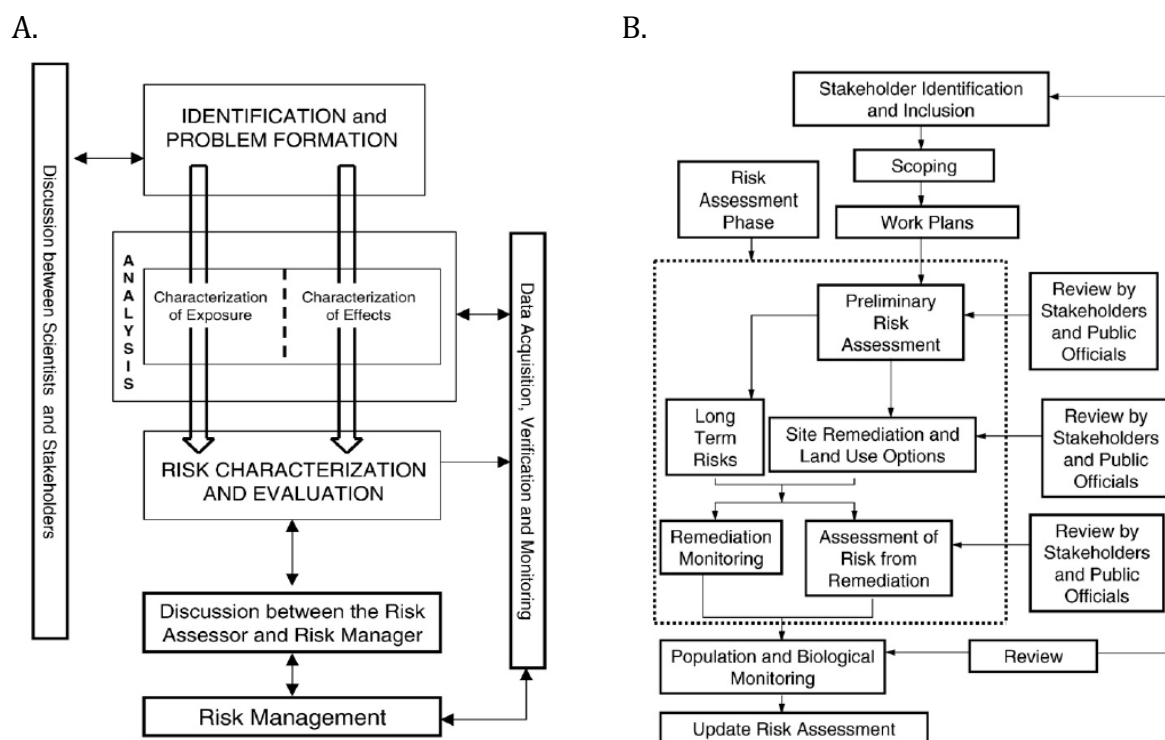


Figure 9 : Evaluation de l'état sanitaire des écosystèmes : **A.** Analyse des perturbations des écosystèmes **B.** Gestion des écosystèmes (Burger, 2008).

3.2 Techniques de traitement de la pollution

Les techniques de réhabilitation doivent être adaptées à la nature chimique des polluants et à leur dangerosité. Deux possibilités se présentent alors (1) l'immobilisation qui consiste à modifier la mobilité des polluants ou leur toxicité, en agissant par exemple sur le niveau d'oxydoréduction, la complexation ou la précipitation, ou alors en modifiant le milieu récepteur par réduction de la perméabilité et de la porosité ou (2) la destruction partielle ou totale de la pollution en utilisant des procédés chimiques, thermiques, physiques ou biologiques (Rapport Final BRGM/RP - 58609 – FR Juin 2010). Les stratégies de traitement des matrices polluées reposent sur des opérations dites 'hors site', 'sur site' et '*in situ*' (Simonnot and Croze, 2008).

Ces opérations de traitement peuvent être résumées comme suit (**Fig 10**) :

- les traitements 'hors site' supposent l'excavation/extraction du milieu pollué (déchets, terre, eau) et son évacuation vers un centre de traitement spécialisé (incinérateur, centre d'enfouissement technique, ...),
- les traitements 'sur site' consistent à excaver les terres ou les eaux polluées et à les traiter sur le site même,
- les traitements '*in situ*' correspondent à un traitement sans excavation, le sol et les eaux souterraines sont laissés en place. Il s'agit alors soit d'extraire le polluant seul, soit de le dégrader ou de le fixer dans le sol,
- confinement : il consiste à empêcher/limiter la migration des polluants. Cette méthode peut être combinée au traitement 'sur site' et '*in situ*' et ne pas faire l'objet d'une technique de traitement à part entière.

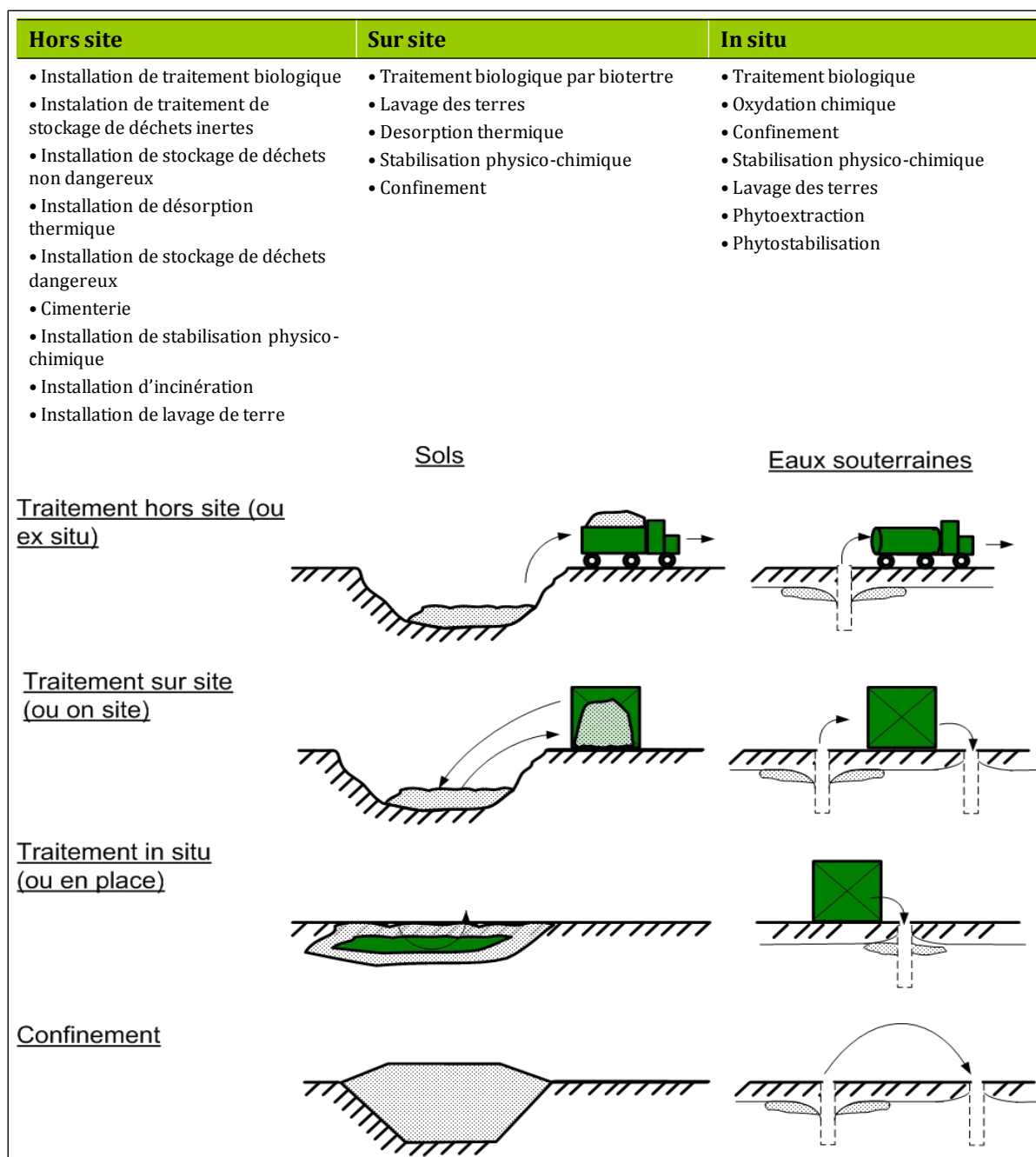


Figure 10 : Techniques de dépollution des sites par lieu de traitement ainsi que les détails des différents procédés (Hyman and Dupont 2001, ADEME 2009)

Les méthodes 'hors site' et 'sur site' sont écologiquement destructrices et les matrices ainsi traitées perdent leurs fonctions fondamentales et sont considérées comme un déchet qu'il faut éliminer. Ces techniques ont beaucoup évolué durant les deux dernières décennies permettant ainsi des projets économiquement réalisables et un abattement satisfaisant des pollutions pour de petits volumes. Elles sont bien

adaptées aux zones polluées urbaines à forte pression foncière. L'utilisation de ces techniques représente 75% des traitements des sites pollués (**Fig. 11**).

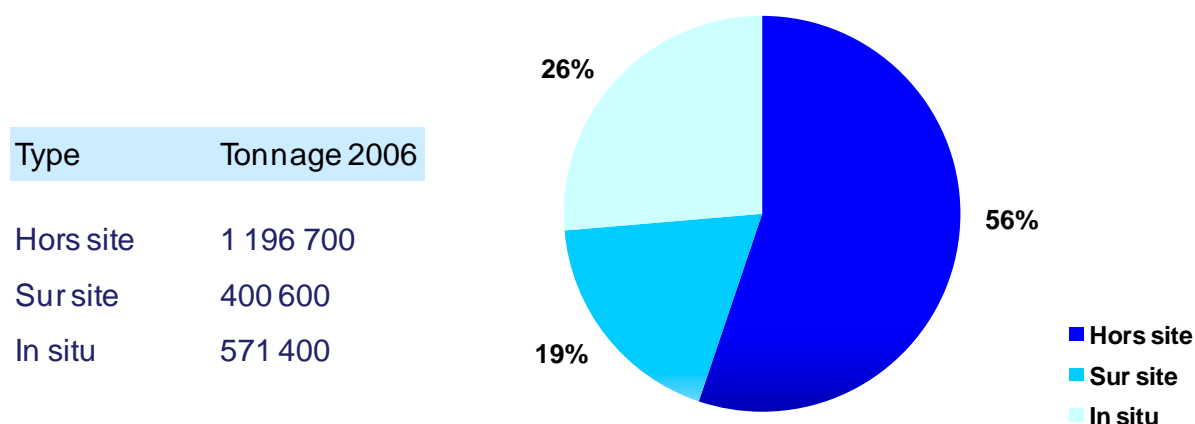


Figure 11 : Taux d'utilisation des différentes techniques de traitement des sites pollués en France en 2006 (ADEME 2009)

Cependant, pour des surfaces polluées plus importantes, de plusieurs centaines à plusieurs milliers d'hectares, les solutions économiquement et techniquement possibles sont rares. L'excavation des terres polluées n'est pas envisageable sur de telles surfaces et seul le traitement *in situ* est possible. En France, ce type de remédiation *in situ* est utilisé dans 26% des cas de dépollution (**Fig 11**). Des développements technologiques ont été et sont en cours d'élaboration afin de stabiliser et/ou d'éliminer la pollution par des techniques physico-chimiques (flux électrique,...) et thermiques. En ce qui concerne les matrices contaminées par les OCs, les techniques appliquées sont principalement la déhalogénéation mécanique, la décomposition catalysée par une base (Base Catalyzed Decomposition), la réduction en phase gazeuse (Gas Phase Chemical Reduction), la réduction par électrons solvatés (Solvated Electron Technology) et la vitrification *in situ* (Vijgen, 2002). Par ailleurs des techniques biologiques faisant intervenir des organismes vivants (microorganismes, plantes, animaux) sont de plus en plus appliquées et trouvent un écho favorable auprès des pouvoirs publics et des populations.

3.3 L'utilisation d'organismes vivants pour le traitement in situ de sites pollués : la phytoremédiation

L'utilisation pour la remédiation d'organismes vivants se développe de plus en plus et les termes de phyto-remédiation, bio-remédiation, éco-remédiation, sont devenus des mots d'usage sinon courants du moins intuitivement assez bien compris (Felsot 1996, Overcash 1981, Kruger et al. 1997). Ces stratégies sont souvent basées sur la présence d'une biomasse globale importante dont les espèces sont sélectionnées et adaptées au stress chimique existant dans le système. Ces possibilités d'adaptation sont très souvent le fait d'organismes à multiplication rapide, possédant des temps de génération courts et dont les adaptations à des contraintes environnementales sont fréquentes. La création et la mise en place de ces stratégies de remédiation sont basées sur l'observation de scientifiques qui ont montré que certaines plantes et microorganismes pouvaient se développer spontanément dans des milieux fortement pollués (Shelton et al. 1992). D'un point de vue pratique, certaines stratégies de remédiation représentent un succès réel et sont utilisées communément de nos jours. C'est le cas des stations de lagunages à macrophytes (*Typha*, *Phragmites*) utilisées pour purifier l'eau ou des sols agronomiques dont la charge polluante en pesticides est diminuée par un couvert végétal approprié. L'ensemble de ces techniques se retrouve sous le terme générique d'écoremédiation (Tissut et al. 2006). Effectivement, les organismes phares (plantes, animaux) utilisés sont souvent associés à une microflore particulière dont l'action conjointe explique l'efficacité globale de remédiation.

3.3.1 Historique

Les végétaux adaptés à la vie terrestre font l'interface entre un substrat hydraté, le complexe argilo-humique et l'atmosphère dans laquelle se développent les parties aériennes des végétaux. Les plantes supérieures représentent de véritables pompes à eau dont le flux hydrique traverse la plante depuis les racines jusqu'aux feuilles et dont le moteur est la transpiration foliaire. Par ce transfert qui peut être puissant (un hectare de maïs en pleine végétation transfère par ce mécanisme 50 m³ d'eau par jour (Tasli, 1995), les plantes sont capables d'extraire et d'accumuler au sein de leurs tissus des

xénobiotiques variés comme les métaux et métalloïdes, les hydrocarbures, les solvants chlorés, les pesticides. L'efficacité de cette phytoremédiation dépend des propriétés physico-chimiques des polluants, de leur mode d'action, de leur biodisponibilité (type de sol, teneur en matières organiques,...), des facteurs climatiques et des espèces végétales (Tissut et al. 2006).

Cette technique utilisée dès l'antiquité par les Grecs et les Romains, n'aura été utilisée à grande échelle qu'à la fin du XIX^{ème} siècle avec la dépollution des eaux usées par les cultures agricoles (Adolphe-Auguste Mille et Alfred-Durand Claye, 1871). A cette époque la ville de Paris met en place un hectare de « jardin modèle » ouvert au public, pour convaincre les cultivateurs de la plaine de Gennevilliers des vertus fertilisantes de ces eaux d'égouts. Petit à petit, la Ville de Paris y consacre 5 100 ha. En 1901, une lagune de 200 ha est construite au Texas (San Antonio), puis peu de temps après, en Allemagne (Munich) avec 233 ha. En 1912, la première zone humide pour l'épuration des eaux usées naît dans le Massachussetts. Depuis les années 1980-90, les techniques de phytoremédiation se perfectionnent et se développent à travers le monde avec la création de villes incluant *in situ* des systèmes de traitement des eaux usées (Ecolonia, Pays-Bas ; Kolding, Danemark). Aux Etats-Unis, l'EPA (Environmental Protection Agency) recensait, dès les années 1990, 150 projets de phytoremédiation pour éliminer divers polluants tels que les solvants chlorés, les explosifs, les combustibles, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les composés d'hydrocarbures pétroliers, les radionucléides et les métaux lourds (Pilon-Smits 2005, Campos et al. 2008). Depuis les années 2000 ce concept se généralise dans le monde ; l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis publie le premier guide de phytoremédiation (United States Environmental Protection Agency (EPA) 2000) et la Communauté Européenne finance des réseaux scientifiques de recherches dans ces thématiques, par exemple le COST 837 « *Plant biotechnology for the removal of organics pollutants and toxic metals from wastewaters and contaminated sites* » et le COST 859 « *Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety* », qui rassemblent plus de 250 scientifiques dans plus de 29 pays, pour perfectionner les essais 'terrain' et comprendre les mécanismes physiologiques impliqués.

3.3.2 *Les aspects économiques*

Très peu de données sur le coût d'une telle technique sont mentionnées dans la littérature (**Tableau 5**). Cependant, la phytoremédiation apparaît nettement moins chère que les méthodes traditionnelles de traitement allant de 100 à 10 000 fois moins onéreuse (INRA, 2009). Cette option est également avantageuse pour les sites qui ne requièrent pas une restauration à court ou à moyen terme et pour des sols moyennement à faiblement contaminés pour lesquels le coût d'une dépollution par voie physico-chimique est souvent prohibitif. De plus, il faut noter que les produits issus de la phytoremédiation peuvent être valorisés ; i.e. compostage de la biomasse végétale, obtention d'énergie calorifique ou électrique (INRA, 2009). Cependant, il existe également des limites économiques à cette méthode. En effet, le facteur limitant de ces techniques reste le temps de restauration des milieux allant parfois au-delà d'une dizaine d'années ; contrainte économique de gestion de l'espace et de son usage qui ne permet pas l'application systématique de cette technologie. Par ailleurs, les industriels hésitent parfois à l'emploi de cette méthode car juridiquement, tout traitement de dépollution d'une durée de plus de six mois entraîne le passage d'une installation classée légère à une installation classée lourde, ce qui entraîne un surcoût et des contraintes juridiques (INRA, 2009).

Tableau 5 : Comparaison des coûts entre les technologies traditionnelles de dépollution et la phytoremédiation (Green and Hoffnagle, 2004).

Traditional Method	Scenario	Estimated Cost	
		Traditional Method	Phytoremediation
Pump and Treat	1-acre site with 20-foot-deep Aquifer	\$660,000	\$250,000
Conventional Technology	Army Ammunition Plant	\$1 trillion	\$1.8 million
Traditional Curb and Gutter	SEA Streets Runoff Buffer	\$1 million	\$850,000
Standard Landfill Cap	Landfill Vegetative Cap - College Park	\$10 million	\$3-4 million
Activated Carbon System	Army Ammunition Plant - Milan	\$4.00/ 1000 gal	\$1.80/ 1000 gal
Pump & Treat / Iron Barrier	PCE in Groundwater	8.90/5.30 \$/1000 gal	\$2.00/1000 gal
Flushing/ Vitrification	Metals in Soils	75-210/300-500 \$/Ton	\$25-100/Ton

(Green and Hoffnagle, 2004) Base de données de phytoremédiation. Etudes de terrain concernant les solvants chlorés, les pesticides, les explosifs et les métaux (US EPA Office of Superfund Remediation and Technology Innovation Washington, DC www.clu-in.org).

3.3.3 Les différents mécanismes de phytoremédiation

Les processus de phytoremédiation sont adaptés à la gestion des pollutions organiques et sont optimaux lorsque les polluants possèdent les caractéristiques physico-chimiques suivantes : masse moléculaire suffisamment faible ($PM < 500$), lipophilie intermédiaire ($1,5 < \log K_{ow} < 3,5$) et de préférence non ionisables aux pH biologiques ($4,5 < pH < 8,5$) (Tasli et al. 1996, Raveton et al. 1997, Ravanel et al. 1999, Raveton et al. 1999, Chaton et al. 2001, Aajoud et al. 2003, Marcacci et al. 2005, Aajoud et al. 2006). Les polluants peuvent être ainsi, extraits des matrices contaminées, stockés, transférés et/ou détoxiqués par différents mécanismes. Les processus de métabolisation peuvent intervenir de façon espacés dans le temps ou conjointement, aboutissant à un système complexe d'interactions physiologiques et biochimiques au sein de la plante et

des organismes associés. Les différents mécanismes définissant le terme générique de "phytoremédiation" sont détaillés ci-dessous (**Fig 12**).

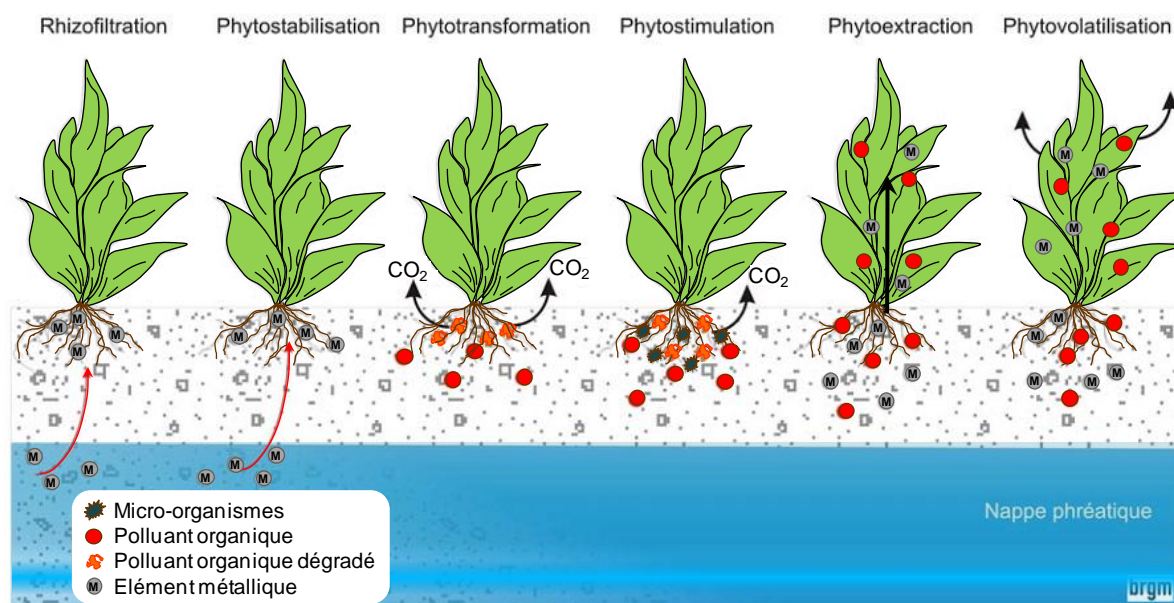


Figure 12 : Récapitulatif des différents processus de phytoremédiation décrit par le BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières)

La phytoextraction ou **phytoaccumulation** : la phytoextraction définit l'absorption des polluants à partir de matrices contaminées par les plantes (**cf. chapitre 2**). La phytoaccumulation est définie par une concentration très importante de contaminants non dégradés rapidement ou très lentement dans la plante. On parle alors de plantes accumulatrices et/ou hyperaccumulatrices capables de tolérer et d'accumuler ces polluants.

La phytostabilisation est un autre mécanisme qui est utilisé dans le but de minimiser la dispersion des polluants dans le sol. Ce procédé tire avantage de la capacité qu'ont les plantes, au niveau des racines, à modifier les conditions environnementales du sol, telles que le pH et la teneur en humidité. En jouant sur les caractéristiques physico-chimiques de la rhizosphère et sur la structure des communautés microbiennes, les plantes peuvent influencer le piégeage et la biodégradation des polluants.

La phytotransformation ou **phytodégradation** : Un contaminant peut être détoxiqué (voire complètement minéralisé) par les systèmes enzymatiques des plantes capables de

catalyser leur dégradation (Dec and Bollag 1994, Strand et al. 1995) (**cf. paragraphe 5**) Cette métabolisation peut avoir lieu dans les tissus de la plante ou dans les microorganismes associés de la rhizosphère (rhizodégradation). La plante peut exsuder des substances nutritives vitales au développement des microorganismes qui pourront jouer un rôle bénéfique de biodégradation des polluants. On parle alors de phytostimulation.

La rhizodégradation : La rhizosphère est une zone de croissance microbienne et de surface d'échange entre le sol, les microorganismes et la plante (Lorenz Hiltner 1904, Curl and Truelove 1986) (**Fig 13**). Les communautés microbiennes (bactéries, champignons, mycorhizes) peuvent agir sur l'absorption et la biodégradation des polluants facilitant l'absorption ultérieure des polluants primaires et secondaires par la plante.

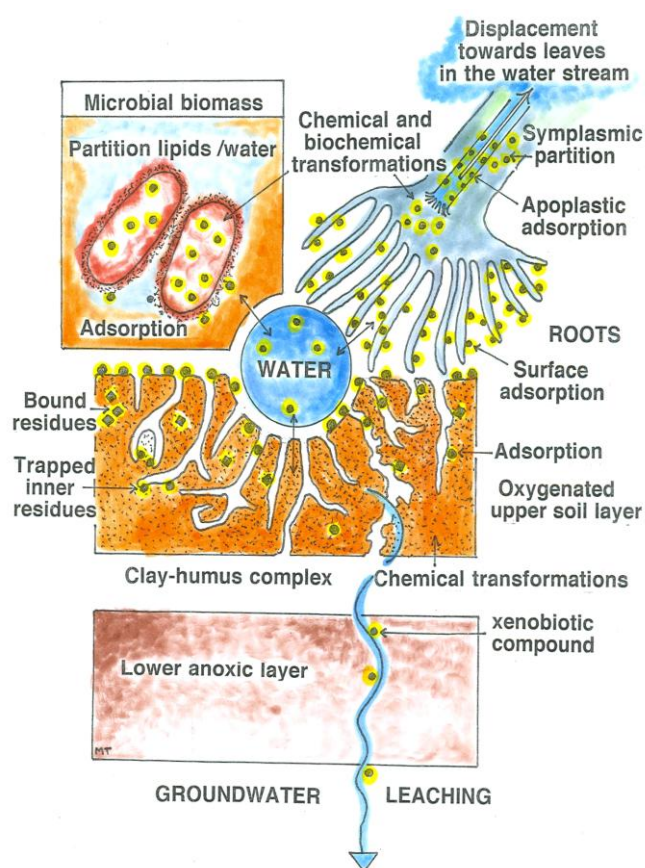


Figure 13 : Consortium eau/complex argilo-humique/biomasse microbienne (Tissut et al. 2006). Les points représentent les xénobiotiques dans l'écosystème.

La phytovolatilisation est un mécanisme particulier par lequel les plantes phytoextractrices peuvent libérer les polluants dans l'atmosphère *via* les zones foliaires d'échanges gazeux que sont les stomates (Zayed and Terry 1994). Ce processus observé

pour des polluants volatiles (Barac et al. 2004, Taghavi et al. 2005) est un mécanisme négatif en terme de phytoremédiation puisque la pollution se trouve déplacée d'un compartiment à un autre sans diminution quantitative de la charge polluante et parfois sans diminution du pouvoir toxique de ces polluants.

La dépollution de matrices contaminées semble envisageable par phytoremédiation, encore faut-il trouver les espèces végétales capables d'être tolérantes à la pression chimique et de présenter un rendement d'extraction quantitativement important et rapide. Il faut veiller à choisir des espèces végétales ne favorisant pas la phytovolatilisation. Le piégeage physique du xénobiotique dans les matrices végétales permet de gérer la pollution en tant que 'déchet' grâce à une transformation de cette biomasse par la mise en place de filières appropriées. En fonction du type de pollution et des matrices contaminées, de nombreuses études ont permis de lister les mécanismes mis en jeux lors de l'application des techniques de phytoremédiation sur différents types de polluants (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Différents types de traitements en fonction du polluant à extraire ou à traiter (Susarla et al. 2002)

Phytoremediation mechanisms	
Type	Chemicals Treated
Phytoaccumulation/ phytoextraction,	Cadmium, chromium, lead, nickel, zinc and other heavy metals, selenium, radionuclides; BTEX (benzene, ethyl benzene, toluene and xylenes), pentachlorophenol, short-chained aliphatic compounds, and other organic compounds
Phytodegradation/ phytotrans- formation	Munitions (DNT, HMX, nitrobenzene, nitroethane, nitromethane, nitrotoluene, picric acid, RDX, TNT), atrazine; chlorinated solvents (chloroform, carbon tetrachloride, hexachloroethane, tetrachloroethene, trichloroethene, dichloroethene, vinyl chloride, trichloroethanol, dichloroethanol, trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, monochloroacetic acid, tetrachloromethane, trichloromethane), DDT; dichloroethene; methyl bromide; tetrabromoethene; tetrachloroethane; other chlorine and phosphorus based pesticides; polychlorinated biphenols, other phenols, and nitriles
Phytostabilization	Proven for heavy metals in mine tailings ponds and expected for phenols and chlorinated solvents (tetrachloromethane and trichloromethane)
Phytostimulation	Polycyclicaromatic hydrocarbons; BTEX (benzene, ethylbenzene, toluene, and xylenes); other petroleum hydrocarbons; atrazine; alachlor; polychlorinated biphenyl (PCB); tetrachloroethane, trichloroethane and other organic compounds
Phytovolatilization	Chlorinated solvents (tetrachloroethane, trichloromethane and tetrachloromethane); mercury and selenium
Rhizofiltration	Heavy metals, organic chemicals; and radionuclides

La phytoremédiation semble être appliquée avec succès sur les polluants chlorés, notamment avec des rendements de **phytoextraction** et **phytodegradation** positifs (**Tableau 6**). Cependant, certaines études ont pu démontrer que les solvants chlorés peuvent être **phytostabilisés** mais aussi pour les plus volatils **phytovolatilisés** (**Tableau 6**). En ce qui concerne le lindane et ses isomères, des études ont montré que

le taux de résidus Σ HCH dans le sol est plus important dans les parcelles non cultivées que dans des parcelles céréalières comme le maïs (*Zea mays*) ou le blé (*Triticum spp*) (Singh et al. 1991, Chaudhry et al. 2002). Par ailleurs, les Σ HCH sont détectés dans plusieurs plantes, incluant la laitue (*Lactuca sativa*) (Kohli et al. 1976) le sésame (*Sesamum indicum*), l'hydrille (*Hydrilla verticillata*) (Waliszewski 1993), la calebasse (*Lagenaria siceraria*), le melon amer (*Momordica charantia*), le luffa (*Luffa cylindrica*), l'épinard (*Spinacia oleracea*) (Hans et al. 1999) et le choux chinois (*Brassica campestris*) (Westcott 1985).

Chez ces différentes espèces, les résidus de Σ HCH ont été retrouvés dans les plantes cultivées sur sol contaminé, avec une absorption passive essentiellement par contact. D'autres études en revanche ont permis de mettre en évidence une absorption par voie racinaire *via* la systémie xylémienne jusqu'aux parties aériennes de la plante. C'est le cas d'une variété de piment (*Capsicum annuum*) et de la coriandre (*Coriander sativum*) capables d'extraire le lindane en système hydroponique (Ma and Burken, 2003, Wilson et al.1999).

Dans la littérature, certaines études témoignent des capacités de phytoextraction et de bioaccumulation des chlorobenzènes dans les plantes (soja, carotte, épinard, chou, céleri, tomate) à partir de sols contaminés (Wang and Jones 1994b, a, Wang et al. 1996, Kraaij and Connell 1997, Zhang et al. 2005). Ces résultats montrent alors qu'il est possible d'utiliser des techniques de phytoremédiation dans le cadre d'une pollution aux OCs.

4. Phytotoxicité et Stress oxydant chez les plantes exposées à la pollution

4.1 Phytotoxicité décrite pour les OCs

La phytoremédiation est une technique qui utilise l'efficacité des plantes pour dépolluer les matrices et pour que ce rendement soit optimal les plantes doivent tolérer le stress et la toxicité liés à la pression chimique. Dans le cas des organochlorés, il a été démontré que le lindane pouvait inhiber la germination et le développement de la plantule (mesuré par pesée de la biomasse) de plusieurs espèces végétales, *e.g. Triticum, Trifolium, Avena, Pisum*, etc (Lichtenstein et al. 1962, Salazar and Paulsen 1971, Verma and Pillai 1991, Pereira et al. 2010). Par ailleurs, il apparaît que l'exposition au lindane induirait un effet négatif sur le contenu chlorophyllien des plantes (Toba et al. 1988, Babu et al. 2001, Mostafa and Helling 2002, Friesen-Pankratz et al. 2003). Le lindane a été décrit comme un inhibiteur du transfert électronique chloroplastique au niveau du PSII à des concentrations supérieures ou égales à 5 mg l⁻¹ au bout de 24h d'exposition (Bueno et al. 2004).

Comparativement, un nombre plus modeste d'études a été mené sur les effets phytotoxiques des chlorobenzènes (Kong et al. 1998, Calabrese and Baldwin 2002) (Liu et al. 2003, Liu et al. 2004, Monferran et al. 2007). L'effet phytotoxique communément mesuré sur les plantes exposées aux CBs est une inhibition du développement, i.e. algues (Calamari et al. 1983, Calabrese and Baldwin 2002), macrophytes (Monferran et al. 2007) (Ma and Havelka 2009), et les plantes cultivables (Wang et al. 1996, Liu et al. 2003, Liu et al. 2004). D'autres études ont montré que les HCHs et les CBs pouvaient induire des effets génotoxiques comme la formation de micronoyaux, des aberrations chromosomiques ou encore des cassures de l'ADN ; ces effets sont généralement détectés au niveaux des zones méristématiques racinaires (Liu et al. 2003, Liu et al. 2004).

D'autres travaux encore démontrent qu'une exposition prolongée au 1,4-DCB jouerait un rôle inhibiteur sur la croissance des plantes de *P. australis* (Ma and Havelka 2009) ainsi que sur le développement cellulaire de plantes cultivables telles que la tomate, le soja et la carotte (Wang et al. 1996).

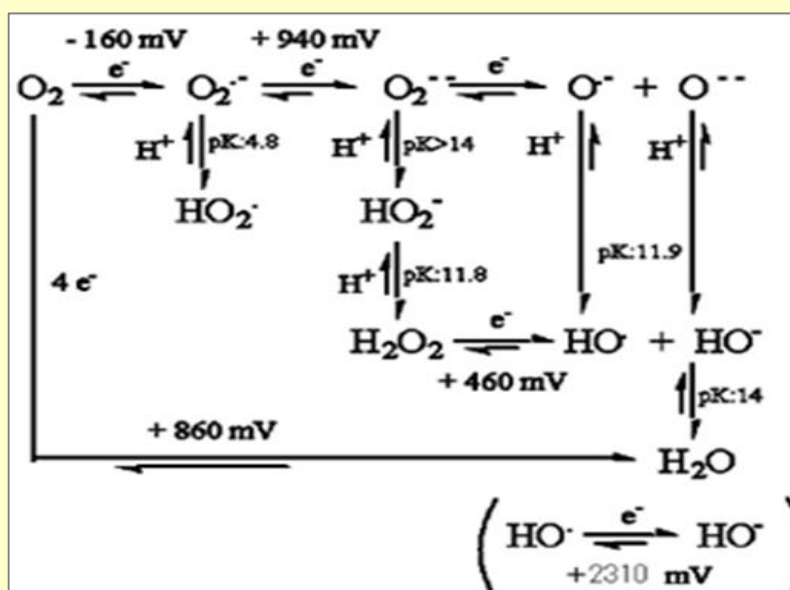
4.2 Le Stress oxydant lié à l'exposition aux polluants

Sous la pression de conditions environnementales défavorables, les plantes subissent des stress, qui peuvent aboutir à une diminution de croissance végétale, avec de possibles apparitions d'anomalies morphologiques ou génétiques, conduisant dans certains cas à la mort de la plante. Les polluants peuvent déclencher ces mécanismes de stress en générant des Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) comme cela est décrit dans de nombreuses études concernant les métaux lourds (Landberg and Greger 2002, Paradiso et al. 2008) les pesticides (Geoffroy et al. 2004, Sunohara and Matsumoto 2008), les HAPs (Liu et al. 2009), les organochlorés (Monferran et al. 2007, Michalowicz and Duda 2009) et des composés naturels issus du métabolisme secondaires (phytohormones, composés allélochimiques, gaz, etc.) (Qian et al. 2009).

4.2.1 Les Espèces Réactives de l'Oxygène

L'oxygène peut subir plusieurs réductions mono-électroniques successives aboutissant à la formation d'espèces partiellement réduites de l'oxygène appelées Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS, Reactive Oxygen Species) pouvant être toxiques pour les organismes vivants. Les ROS (**Fig 14**) peuvent être des espèces radicalaires, telles que le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ ou le radical hydroxyle HO^{\bullet} ou non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou l'hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}). Chacune de ces espèces possède une réactivité différente (Winterbourn 2008). Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le principal précurseur des autres ROS (Imley 2008). En se dismutant, il forme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, par la réaction de Fenton, est à l'origine de la formation de l'espèce la plus toxique pour la cellule, le radical hydroxyle (HO^{\bullet}).

(a)



(b)

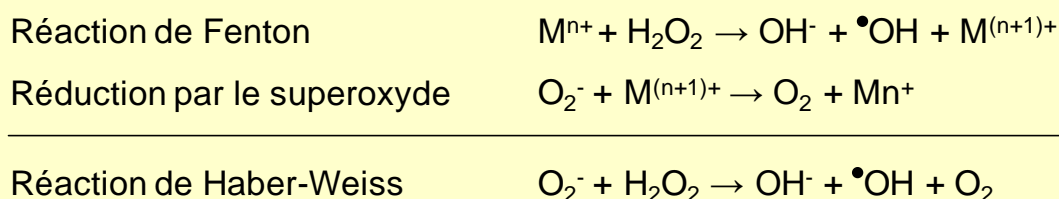


Figure 14 : Réductions partielles de l' O_2 (Pierre and Fontecave 1999). **(a)** Transfert d'électrons et de protons conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), du radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et de l'anion hydroxyle (HO^-). **(b)** Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle (M : métal)

Le HO^{\bullet} est un agent oxydant très puissant vis-à-vis de toutes les macromolécules présentes dans la cellule. L'oxygène peut également se transformer en oxygène singulet au cours de réactions photochimiques. Il induit des dommages cellulaires similaires à ceux produits par HO^{\bullet} . Ces ROS sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même et sont à l'origine du processus de stress oxydant (Imlay 2008).

4.2.2 Les moyens de défense contre le stress oxydant chez les plantes

Siess décrit en 1991 le stress oxydant comme étant un déséquilibre entre les systèmes prooxydants (respiration cellulaire, radiation, xénobiotique) et antioxydants (enzymes, vitamines, pigments...) en faveur des premiers et source d'effets toxiques potentiels (**Fig 15**).

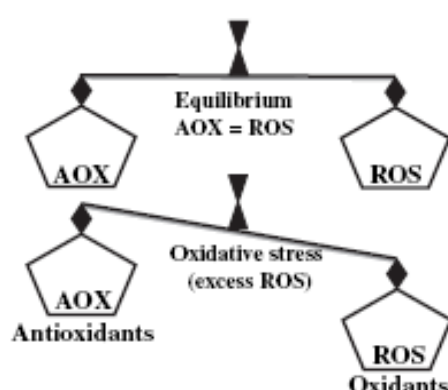
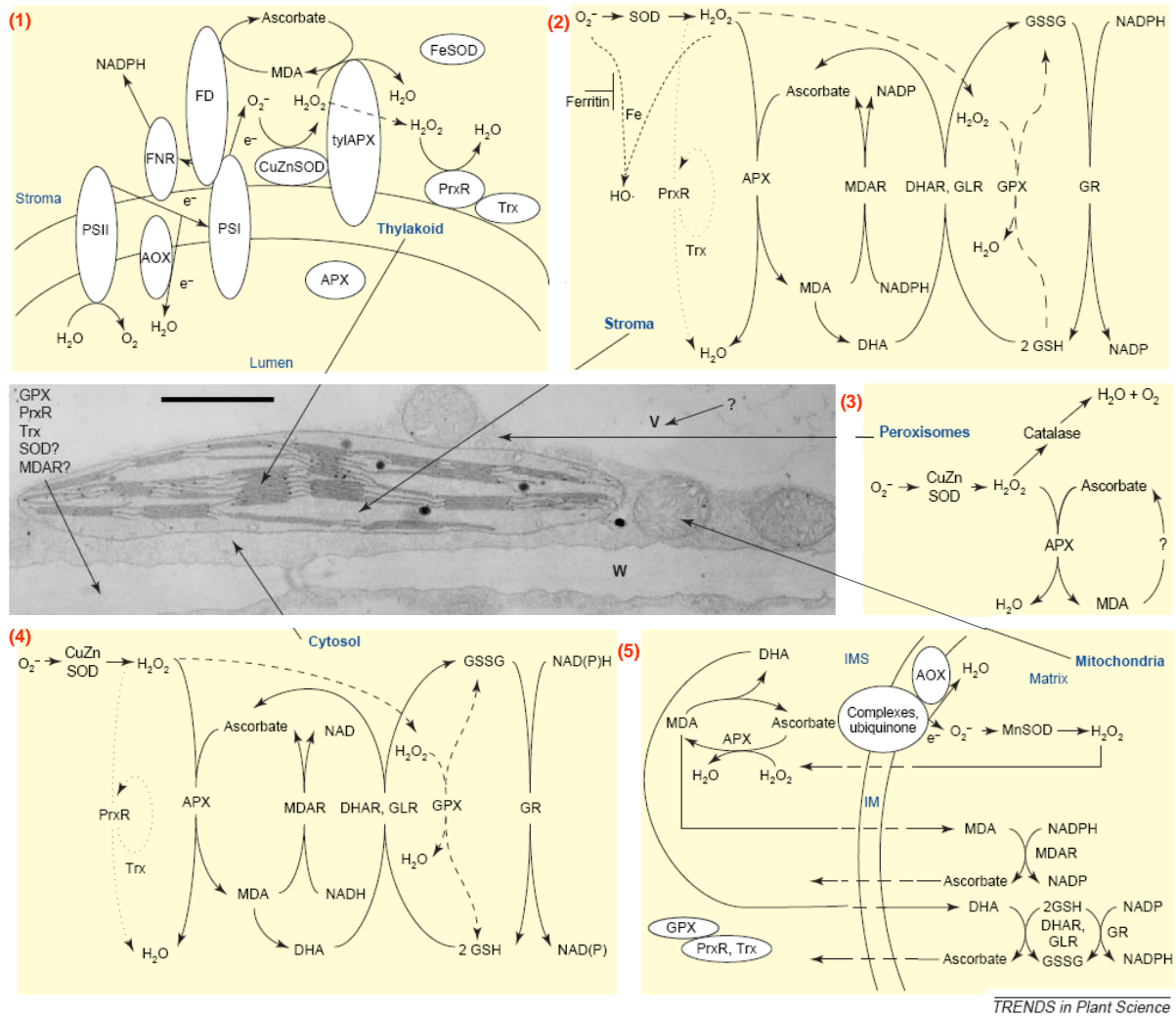


Figure 15 : Equilibre entre les antioxydants (AOX) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Gill and Tuteja 2010)

Les organismes utilisent des petites molécules (vitamines, chélateurs,...) et différents systèmes enzymatiques pour piéger et gérer le stress oxydant (**Fig 16**) (Mittler et al. 2004). L'élimination du radical superoxyde est catalysée par des métallo-enzymes, les superoxydes dismutases (SOD) présentes dans tous les organismes (Niviere and Fontecave 2004). Les SODs catalysent la formation de H_2O_2 et d' $O_2^{\cdot-}$. H_2O_2 est une molécule "signal" clé chez les plantes, caractérisée par un temps de vie relativement long (Mittler et al. 2004, Foyer and Noctor 2005, Zimmermann and Zentgraf 2005) dont la détoxification est assurée par les catalases et les peroxydases (**Fig 16**) (Foyer and Noctor 2005, Zimmermann and Zentgraf 2005, Imlay 2008). Ces enzymes catalysent la transformation de H_2O_2 en molécule H_2O .



TRENDS in Plant Science

Figure 16 : Voies de gestion des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau des cellules végétales. Au centre photo d'une cellule végétale (microscopie électronique à transmission). (1) L'oxydase alternative (AOX) réduit le taux de production de O_2^- dans les thylakoïdes [chez certaines plantes, la superoxyde dismutase (FeSOD) pourrait remplacer le CuZnSOD dans le chloroplaste]. (2). Les ROS qui échappent à ce cycle et/ou qui sont produits dans le stroma, subissent le processus de détoxication par la SOD et le cycle ascorbate-glutathion du stroma. La peroxyrédoxine (PrxR) et la glutathion peroxydase (GPX) sont également impliqués dans la suppression du H_2O_2 au niveau du stroma (3) Les ROS produits dans les peroxysomes lors de la photorespiration, oxydation des acides gras ou autres sont décomposés par la SOD, la catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX). (4). En principe, le cytosol contient le même groupe d'enzymes que dans le stroma.. (5) La SOD et d'autres composants du cycle ascorbate-glutathion sont également présents dans les mitochondries. De plus, AOX empêche les dommages oxydatifs dans les mitochondries Bien que les voies dans les différents compartiments soient presque toutes séparées les unes des autres, le H_2O_2 peut facilement diffuser à travers les membranes. Abréviations: DHA, déhydroascorbate; Dhar, réductase DHA; FD, ferrédoxine; FNR, ferrédoxine réductase NADPH; GLR, glutarédoxine; GR, la glutathion réductase; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé; IM, membrane interne; IMS, l'espace IM; MDA, monodéhydroascorbate; MDAR, MDA réductase; PSI, photosystème I; PSII, photosystème II; Trx, thiorédoxine ; tyl, thylacoïdes ; V, vacuole; W, paroi cellulaire (Mittler et al. 2004).

Il existe chez les plantes un bagage enzymatique très varié et codé pour intervenir en réponse aux éventuelles formations de ROS (**Fig 16**). Plus d'une de ces activités

enzymatiques peuvent être retrouvées dans chacun des différents compartiments cellulaires (exemple des activités GPXs, PrxRs et APXs dans le cytosol et les chloroplastes, et des activités APXs et CATs dans les peroxysomes; **(Fig 16)**). De plus, des études ont démontré que les ROS tel que le H_2O_2 pouvaient très bien diffuser entre les différents compartiments cellulaires, d'où cette nécessité d'avoir un bagage enzymatique de défense réparti dans ces mêmes compartiments (Henzler and Steudle 2000).

a. Les peroxydases (POD)

Les plantes possèdent deux classes de peroxydases (classe I : intracellulaire ; classe III : sécrétées dans les parois cellulaires) (Passardi et al. 2004). Les peroxydases (POD, EC 1.11.1.7) sont des petites protéines qui catalysent la réduction à 1 électron des peroxydes ($R-OOH$) en leur alcool correspondant ($R-OH$). Elles possèdent en général une cystéine au niveau de leur site actif capable de réaliser une attaque nucléophile sur la fonction peroxydique. Cette réaction conduit à la libération de $R-OH$ ainsi qu'à la formation transitoire d'un acide sulfénique ($R-SOH$) (Wood et al. 2003). Cet acide sulfénique réagit avec une autre cystéine pour former un pont disulfure. L'anion peroxyde (H_2O_2) peut être transformé en H_2O par les catalases et différentes peroxydases (gaïacol peroxydase, ascorbate peroxydase-APX, glutathion peroxydase-GPX) (Landberg and Greger 2002). Les peroxydases sont ensuite régénérées par la réduction des ponts disulfures selon deux grandes voies, celle des thiorédoxines et celle du glutathion (Bindoli et al. 2008).

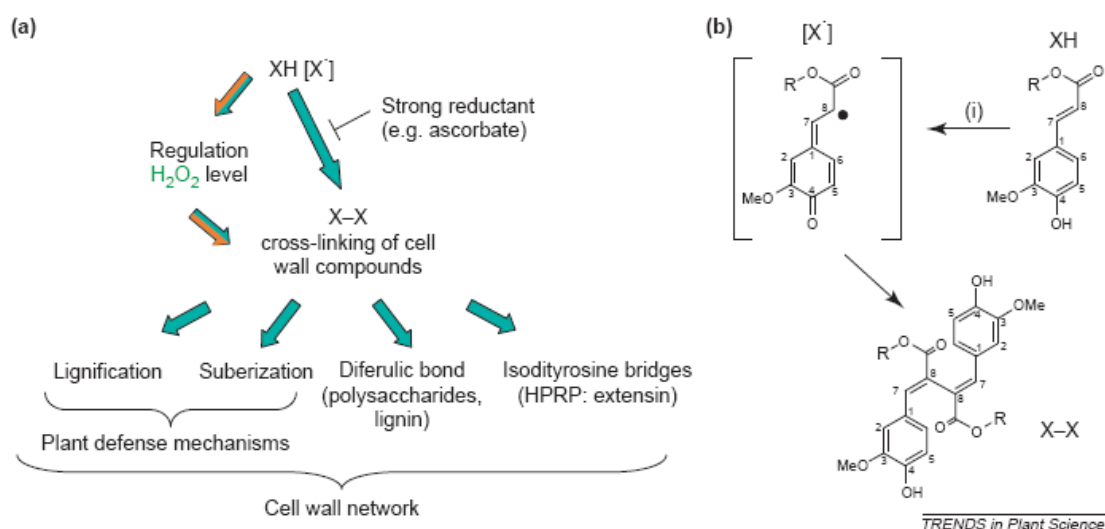


Figure 17 : Mécanisme de peroxydation au niveau des parois végétales (Passardi et al. 2004). **(a)** Les peroxydases catalysent la régulation du H_2O_2 (flèche orange/verte). Par ailleurs, les peroxydases oxydent différents substrats (XH , i.e., monolignols, subérine, acide férulique...). Les radicaux produits (X^\bullet) peuvent conduire à la formation de liaisons entre les polymères des parois cellulaires et les protéines impliquées dans les réactions de défenses. **(b)** Exemple de mécanisme de liaison catalysé par les peroxydases (R : polysaccharide, XH : ferulate ester, $X-X$: 8-8-déhydroferulate ester).

Les peroxydases de classe III sont présentes sous formes solubles dans l'apoplaste pariétal ou liées de façon covalente ou ionique à la paroi cellulaire (Passardi et al. 2004). Ces peroxydases joueraient un rôle dans la protection des membranes des cellules végétales face aux ROS (essentiellement H_2O_2) et catalysent la réduction de nombreux substrats (composés phénoliques, précurseurs des lignines, auxines,...) (Hiraga et al. 2001). Ainsi, les peroxydases pourraient agir sur l'élongation cellulaire et intervenir dans la formation des parois secondaires des cellules (lignification, subérisation,...) en réponse au stress oxydant (**Fig 17**) (Passardi et al. 2004).

b. Glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase NADPH-dépendante (GR, EC 1.6.4.2) permet de recycler le glutathion oxydé (GSSG) produit au cours des mécanismes de détoxication (Chen and Gallie 2004, Saruhan et al. 2009). Notamment, le GSSG est synthétisé lorsque les glutathion-peroxydases catalysent la transformation de H_2O_2 en H_2O . Dès lors, la GR assure la réduction du GSSG en 2 GSH utilisant le NADPH (provenant de la photosynthèse) comme cofacteur (**Fig 18**).

La GR est un composant majeur dans le système enzymatique de défense contre les ROS dans les cellules. Il a été décrit dans des études antérieures que l'activité GR augmentait de façon conséquente chez de nombreuses espèces de plantes au cours de différents types de stress appliqués (Khan et al. 2008). La GR joue un rôle important dans la résistance aux stress oxydatifs générés par des facteurs environnementaux naturels tels que l'ozone, les UV, la salinité ou encore le froid, mais également des facteurs chimiques comme par exemple les métaux et les polluants organiques (Khan et al. 2008).

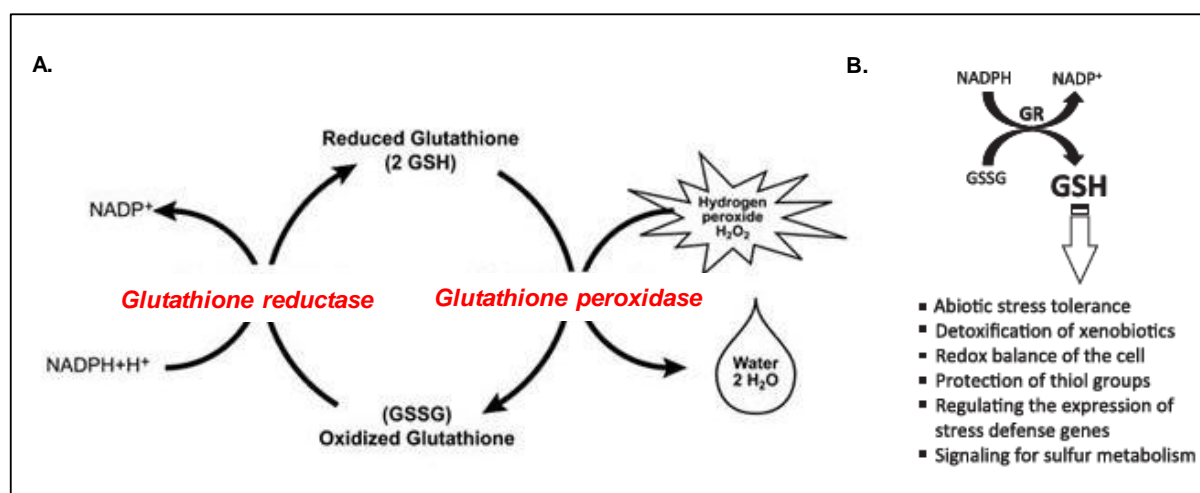


Figure 18 : A. Schéma du recyclage du GSSG par la glutathion réductase après utilisation du GSH pour la détoxication du H_2O_2 par la glutathion peroxydase. B. Glutathion et métabolisme de la plante (Gill and Tuteja 2010).

Chez les plantes l'antioxydant le plus abondant est l'acide ascorbique (vitamine C) qui est oxydé en déhydroascorbate (DHA). Il est rapidement régénéré par la déhydroascorbate réductase (DHAR) qui requière du glutathion comme réducteur (Mittler et al. 2004). La GR est par conséquent une enzyme clé de protection des cellules contre les ROS en maintenant un ratio GSH/GSSG élevé (Apel and Hirt 2004, Foyer and Noctor 2005, Lomonte et al. 2010). Les différentes voies de réponses faisant intervenir la GR ont été largement étudiées et décrites au niveau biochimique et moléculaire (Kotchoni and Gachomo 2006).

5. Phytotolérance et détoxification des polluants dans les tissus végétaux

5.1 Généralités sur la tolérance biochimique

La phytotolérance exprimée chez certaines plantes lorsqu'elles sont exposées à des xénobiotiques peut être liée à plusieurs processus, **(1)** une absence de site d'action (i.e. herbicide sélectif) (Phillips 1990, Hart 1993, Yuan et al. 2007, Yu et al. 2009), **(2)** une capacité à stocker les xénobiotiques dans des zones non-vitales telles que les espaces vacuolaires, les tissus de l'épiderme ou le mésophile, ce qui est le cas par exemple des métaux (Vogel-Mikus et al. 2008, Pongrac et al. 2010, Memon and Schröder 2009), et **(3)** une capacité à détoxifier les xénobiotiques (Campos et al. 2008, Mench et al. 2009, Talano et al. 2010). L'induction de l'expression des enzymes végétales impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques permettra d'assurer une capacité catalytique suffisante pour modifier leurs structures chimiques. Le panel génétique codant pour ces enzymes de détoxification est appelé par certains : 'the plant xenome' (Edwards and Dixon 2005). Les métabolites obtenus sont dans certains cas plus toxiques que la molécule mère, ce qui est le cas en partie d'un grand nombre de proherbicides (ex. pyrate, 2,4-D et composés voisins, bromoxynil, benzoylpro-éthyl...) dont la rupture dans la paroi cellulosique des liaisons esters libère un acide étant la véritable substance active (Tissut et al. 2006). Cependant, dans la majorité des cas, les métabolites présentent une toxicité plus faible voire nulle n'occasionnant aucun dommage à la plante (Raveton et al. 1996, Yuan et al. 2007).

Tableau 7 : Tolérance aux herbicides générée par les P450s, les GSTs ou les GTs (Yuan et al. 2007)

Gene family	Common name	Binomial	Herbicide
P450	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Chlorotoluron
P450	Chickweed	<i>Stellaria media</i>	Mecaprop
P450	Rigid ryegrass	<i>Lolium rigidum</i>	Diclofop-methyl
P450	Rigid ryegrass	<i>Lolium rigidum</i>	Diuron, atrazine, simazine
P450	Rigid ryegrass	<i>Lolium rigidum</i>	Chlorsulfuron
P450	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Chlorotoluron
P450	Sterile oat	<i>Avena sterilis</i>	Diclofop-methyl
P450	Littleseed canarygrass	<i>Phalaris minor</i>	Isoproturon
P450	Wild mustard	<i>Sinapis arvensis</i> (syn. <i>Brassica kaber</i>)	Ethametsulfuron-methyl
P450	Large crabgrass	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Fluazifop-P-butyl
P450	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Fenoxaprop-p-ethyl
P450	Ryegrass	<i>Lolium</i> spp.	Diclofop-methyl
P450	Italian ryegrass	<i>Lolium multiflorum</i>	Diclofop-methyl, fluazifop-P-butyl, tralkoxydim, isoproturon, cycloxydim
P450	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Aryloxyphenoxypropionates (fops), flupyrsulfuron, fenoxaprop-P, ureas, haloxyfop, clodinafop
P450	Late watergrass	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	Bispyribac-sodium, fenoxaprop-ethyl, thiobencarb
GST	Velvetleaf	<i>Abutilon theophrasti</i>	Atrazine
GST	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Fenoxaprop-ethyl and moderately resistant to chlorotoluron, diclofop-methyl, fluazifop-P-butyl and tralkoxydim
GST	Italian ryegrass	<i>Lolium multiflorum</i>	Diclofop-methyl, fluazifop-P-butyl, tralkoxydim, isoproturon, cycloxydim
GST	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Aryloxyphenoxypropionates (fops), flupyrsulfuron, fenoxaprop-P, ureas, haloxyfop, clodinafop
Glycosyl-transferase	Blackgrass	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Multiple herbicides including 2,4,5-TCP and others

Abbreviation: TCP, trichlorophenol.

*Only the cases with confirmed enzyme activity correlating to the herbicide resistance are included in this table.

Les voies de détoxification incluent trois phases possibles (**Fig 19** et **Tableau 7**):

La phase I : Phase de biotransformation, qui converti les xénobiotiques, le plus souvent très lipophiles, en des molécules plus polaires, par le biais de processus d'hydrolyses oxydatives variés et/ou réductives (Komives and Gullner 2005). Cette phase fait intervenir des enzymes de détoxification telles que les monooxygénases à cytochromes P450, estérases, oxydases, déhalogénases

La phase II : Phase de conjugaison, qui converti les xénobiotiques par ajout d'un groupement sucre, acide aminé ou de petits peptides. Cette phase de la métabolisation peut intervenir directement ou après le passage par la phase I de biotransformation. Le conjugué ainsi formé est également plus hydrophile que la molécule de départ et moins toxique, faisant intervenir des enzymes de détoxification avec principalement les Glutathion-S-Transférases (GSTs) et les UDP-Glycosyltransférases (UGTs ou GTs) (Pflugmacher et al. 1999, Loutre et al. 2003).

La phase III : Phase de séquestration/compartimentation des métabolites conjugués dans la vacuole des cellules végétales ou de fixation aux composants de la paroi

cellulaire, comme la lignine, la pectine, la cellulose ou l'hémicellulose (Coleman et al. 1997, Dietz and Schnoor 2001).

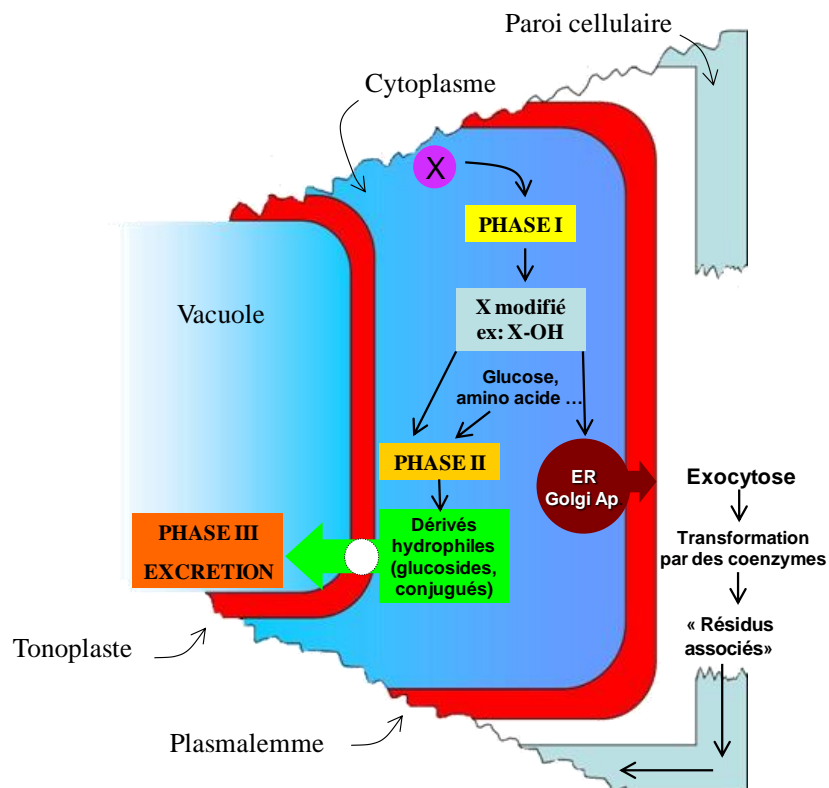


Figure 19 : Mécanisme de métabolisation dans la cellule végétale. X: Xénobiotiques, ER: Réticulum Endoplasmique, Golgi Ap: Appareil de Golgi, Ox: Oxydation, Red: Réduction (Tissut et al., 2006)

5.2 Les enzymes de phase I et les organochlorés

Les polluants chlorés peuvent être détoxiqués par les monooxygénases P450 qui vont catalyser la substitution d'un atome de Cl⁻ par un groupement hydrophile de type –OH. Ces réactions ont été démontrées dans de nombreuses plantes traitées à des herbicides chlorés comme le chlortoluron (Ryan et al. 1981, Fonnepister and Kreuz 1990, Loureiro et al. 2010). Dans le cas des organochlorés, des études ont démontré le potentiel de certaines bactéries associées à la rhizosphère à jouer un rôle dans la déchloration de ces polluants (Kidd et al. 2007). Les processus de dégradation de phase I font intervenir une variété d'enzymes de dégradation pouvant être retrouvées dans les plantes, les champignons, les bactéries endophytes et les bactéries rhizosphériques (Susarla et al. 2002, Singer et al. 2004, Chaudhry et al. 2005).

Dans le cas particulier des plantes, des enzymes de déhalogénéation ont également été mises en évidence chez certaines espèces. C'est le cas par exemple de certaines plantes aquatiques telles que les algues ou le millefeuille aquatique (*Myriophyllum aquaticum*) capables de déhalogéner les solvants chlorés (**Tableau 8**) (Susarla et al. 2002).

Tableau 8 : Enzymes végétales ayant un rôle dans la transformation de composés organiques

Enzyme	Plants known to produce enzymatic activity	Application
Dehalogenase	Hybrid poplar (<i>Populus</i> spp.), algae (various spp.), parrot feather (<i>Myriophyllum aquaticum</i>)	Dehalogenates chlorinated solvents
Laccase	Stonewort (<i>Nitella</i> spp.), parrot-feather (<i>Myriophyllum aquaticum</i>)	Cleaves aromatic ring after TNT is reduced to triaminotoluene
Nitrilase	Willow (<i>Salix</i> spp.)	Cleaves cyanide groups from aromatic rings
Nitroreductase	Hybrid poplar (<i>Populus</i> spp.), Stonewort (<i>Nitella</i> spp.), parrot feather (<i>Myriophyllum aquaticum</i>)	Reduces nitro groups on explosives and other nitroaromatic compounds, and removes nitrogen from rings structures
Peroxidase	Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i> P. Gaertner, Meyer & Scherb)	Degradation of phenols (mainly used in wastewater treatment)
Phosphatase	Giant duckweed (<i>Spirodela polyrhiza</i>)	Cleaves phosphate groups from large organophosphate pesticides

Ces mêmes auteurs citent des exemples de plantes dont les exsudats ou les enzymes sont capables de casser les composés chlorés tels que l'hexachlorobenzène, le pentachlorobenzène ou le trichlorobenzène (**Tableau 9**) (Susarla et al. 2002).

Tableau 9 : Espèces de plantes utilisées dans la phytoremédiation de composés organiques

Plant species	Contaminant
Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Klages)	Hexachlorobenzene, PCBs, pentachlorobenzene, trichlorobenzene
Forage grasses	Chlorinated benzoic acids
Parrot feather Hybrid poplar	Tetrachloroethane (PCE), Trichloroethane (TCE), TNT Atrazine, nitrobenzene, TCE, TNT
Prairie grass	2-chlorobenzoic acid
Soyabean (<i>Glycine max</i> [L.] Merr. Cv. Fiskby v)	Bromacil, nitrobenzene, phenol
Eurasian watermilfoil (<i>Myriophyllum spicatum</i>)	TNT
Waterweed (<i>Eichhornia crassipes</i>)	Pentachlorophenol, PCE, TCE

5.3 Les enzymes de phase II et les organochlorés

Les polluants chlorés sont susceptibles d'être conjugués à de petites molécules polaires de types peptidiques (glutathion, homoglutathion, dérivés de glutamylcystéine, phytochélatines) ou à des sucres (glucose) chez les plantes (Edwards et al. 2000, Messner et al. 2003, Cummins et al. 2011). La conjugaison peut être réalisée sur la molécule mère, mais dans la majorité des cas, ce sont les métabolites issus de la **phase I** qui se trouvent conjugués, puisque les réactions de **phase I** peuvent créer des fonctions électrophiles (ex : hydroxylation, sulfoxydation...) indispensables à la conjugaison.

5.3.1 Les glutathion-S-transférases (GSTs)

Chez les plantes, une des voies principales de détoxification de phase II décrite pour les organochlorés correspond à une conjugaison au tripeptide, glutathion (Glu-Cys-Gly). Cette conjugaison a lieu soit directement sur les polluants primaires, i.e. les herbicides chloroacetanilides (Jablonkai and Hatzios 1993) chloro-s-triazines (Jablonkai and Hatzios 1991, Cherifi et al. 2001) et chloroacétamides (Edwards et al. 2000) et le fongicide chlorothalonil (Wang et al. 2010), soit sur les polluants secondaires issus du métabolisme de phase I, i.e. le 2,4-dichlorophenol (métabolite du trichlorobenzène) (Petroutsos et al. 2008, Schröder et al. 2007), le *p*chlorophenol, métabolite du

dichlorobenzène (Wang et al. 1996, Petroutsos et al. 2007a, Fujisawa et al. 2010) et le pentachlorophénol (Roy and Hanninen 1994).

Ce type de conjugaison est catalysée par les GSTs (EC 2.5.1.18) qui permettent de substituer les groupements électrophiles présents sur des substrats non-polaires endogènes (quinones, phytoaléxines) ou des xénobiotiques par le glutathion réduit (Edwards et al. 2000, Sheehan et al. 2001, Pompella et al. 2003, Udomsinprasert et al. 2005, Allocati et al. 2009). Très hydrophile, le glutathion possède un groupement $-SH_2$ qui correspond à un site nucléophile, site de réaction et de liaison avec les substrats. Il se retrouve en concentration importante dans les cellules où il joue un rôle de protection complexe, notamment pour gérer les espèces réactives oxygénées intermédiaires (ROIs) issus du processus photosynthétique (**Fig 20A**) (Coleman et al. 1997, Hayes and McLellan 1999, Foyer et al. 2001). Dans la majorité des cas les ROIs sont ensuite contrôlés et pris en charge par le métabolisme, mais dans le cas d'une augmentation massive de la quantité de ROIs, ceci peut conduire à un stress oxydant occasionnant des dommages cellulaires (Mittler 2002). Il s'en suit alors la cascade classique de réactions oxydatives vues précédemment.

Les GSTs ont été identifiées et caractérisées dans de nombreux organismes (insectes, bactéries, mammifères) et dans de nombreuses espèces de plantes (Banerjee and Goswami 2010). La détoxification des herbicides par conjugaison au glutathion dans les plantes a été très largement étudiée, notamment chez *Zea mays* (Edwards and Owen 1986, Jablonkai and Hatzios 1991, Scarponi et al. 1992, Jepson et al. 1994, Holt et al. 1995, Marrs et al. 1995, Hatton et al. 1996, Rossini et al. 1996, Dixon et al. 1997, Marrs and Walbot 1997, Cherifi et al. 2001). La conjugaison 'xénobiotique-glutathion' a lieu au niveau cellulaire (cytosolique, mitochondriale et microsomale) dans l'ensemble des tissus végétaux. Le conjugué 'xénobiotique-glutathion' est ensuite exporté du cytosol vers la vacuole et/ou l'apoplaste grâce à la présence de transporteurs transmembranaires de type ABC (Coleman et al. 1997, Bourbouloux et al. 2000, Foyer et al. 2001, Bartholomew et al. 2002, Reade et al. 2004, Bowles et al. 2005, Klein et al. 2006). La séquestration des conjugués au niveau vacuolaire présente de nombreux avantages pour la plante, i.e. assurance d'une protection de l'impact toxique directe du xénobiotique, séquestration à faible coût énergétique pour l'individu, dégradation intravacuolaire (carboxypeptidases) du métabolite conjugué sans risque potentiel pour la fonctionnalité cellulaire (Wolf et al. 1996, Schröder et al. 2003, Schröder et al. 2007).

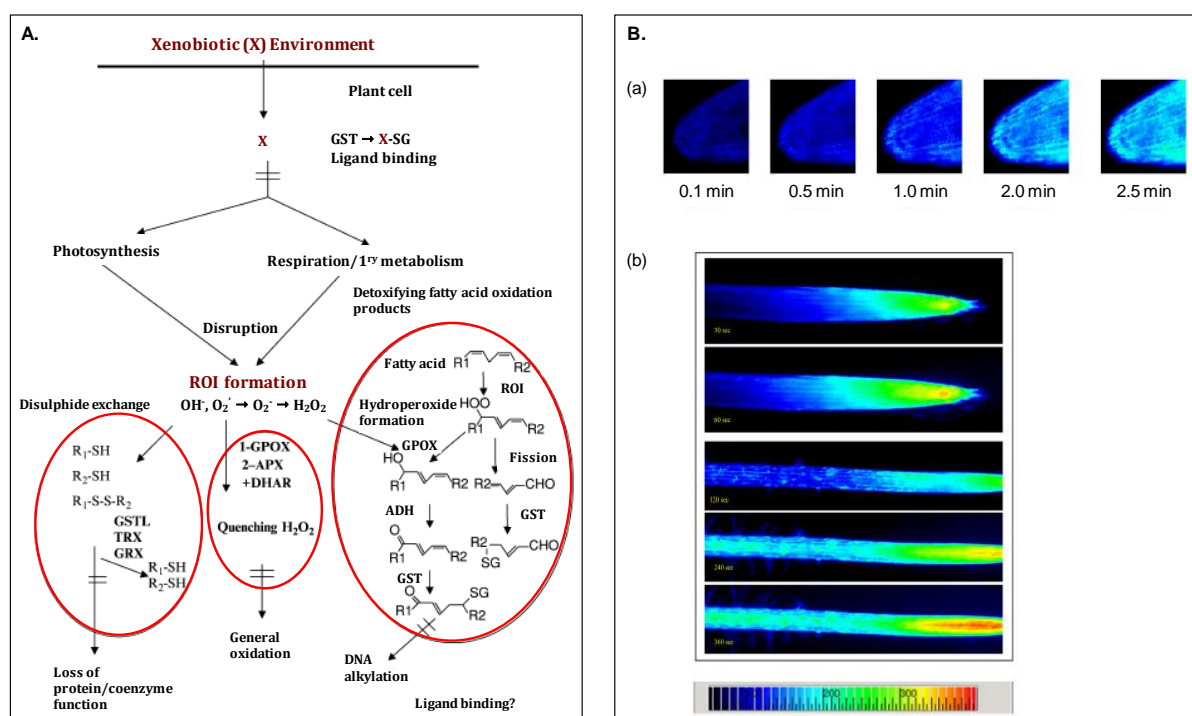


Figure 20 : A. Induction du stress oxydatif par les xénobiotiques et les rôles protecteurs des glutathion-S-transférases (GSTs). (En haut) sont présentés les mécanismes de formation des intermédiaires oxygénés réactifs (ROIs) générés par des xénobiotiques, ainsi que (en bas) les conséquences toxiques pour la cellule. Les réactions dans l'enceinte montrent l'intervention des GSTs dans la détoxification des produits d'oxydation. ADH, alcool déshydrogénase; APX, ascorbate peroxydase; DHAR, déhydroascorbate peroxydase; GPOX, glutathion peroxydase; GRX, glutarédoxine; GSTL, GSTs de classe lambda; ROI, intermédiaires oxygénés réactifs; TRX, thiorédoxine (Edwards et al., 2005) **B.** Progression dans le temps de la fluorescence après application de mono-bromobimane (MBB, sonde fluorescente de marquage des groupes -SH) sur la pointe de racines d'orge âgées de 5 jours (Zeiss Axiovert-20X). Une translocation de la fluorescence en direction de la base des racines a été observée avec une forte augmentation dans les tissus méristématiques de la racine. L'échelle de couleur représente des unités arbitraires (AU) de fluorescence (Schröder et al. 2007).

Cependant, certaines études ont mis en évidence un transport intracellulaire et intercellulaire des conjugués glutathion (Schröder et al. 2007). A partir d'expériences réalisées avec des racines d'orge (*Hordeum vulgare*) il a été démontré qu'une partie de ces conjugués sont transportés à longue distance dans la plante, plutôt que stockés uniquement dans la vacuole. Cette étude représente le premier rapport sur le transport unidirectionnel à longue distance des xénobiotiques conjugués dans les plantes et sur l'exsudation d'un conjugué glutathion à l'extrémité des racines (**Fig 20B**). Ceci permet ainsi de maintenir une faible concentration interne en xénobiotiques potentiellement dangereux pour l'organisme (Schröder et al. 2007). Ces exsudations semblent par ailleurs, influencer la structure communautaire de la rhizosphère notamment au niveau

de la microflore et de la micro-pédofaune qui pourraient trouver de ce fait une source de nourriture intéressante (Diekmann et al. 2004, Schröder et al. 2007).

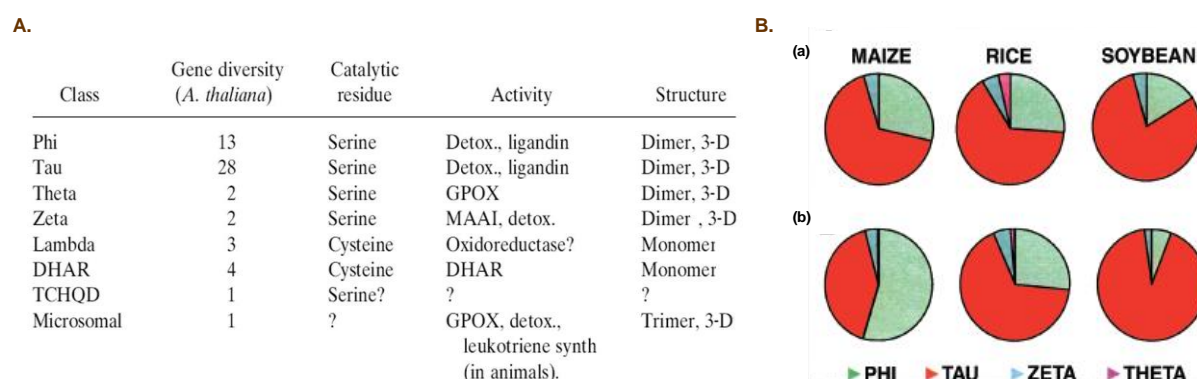


Figure 21 : **A.** Vue d'ensemble des caractéristiques des différentes classes de GSTs végétales (Edwards and Dixon, 2005). **B.** Abondance relative des différentes classes de gènes GST (a) et d'expression (b) chez trois espèces végétales (McGonigle et al. 2000, Frova 2003).

Les GSTs correspondent à une superfamille hétérogène de protéines multifonctionnelles groupées en 8 classes d'isoenzymes (**Fig 21A**) ; les classes Tau et Phi sont spécifiques des plantes et sont les plus représentées dans le règne végétal, les classes Theta et Zeta sont présentes chez les plantes et les animaux, les Lambda et DHAR sont également spécifiques des plantes (Moons 2005). Chez *Z. mays*, les classes de GSTs prépondérantes sont les classes Phi (54%), Tau (41%) et Zeta (4%) (McGonigle et al. 2000, Frova 2003) (**Fig 21B**). Les classes Tau et Phi ont la particularité d'avoir une structure en dimère et de catalyser la conjugaison de divers xénobiotiques avec une prédominance pour les herbicides sélectifs.

5.3.2 Les glycosyltransférases (GTs)

Les polluants chlorés sont activement métabolisés par un autre groupe d'enzymes de conjugaison de phase II très représentées dans le règne végétal, il s'agit des GTs (Glycosyltransférases ; EC 2.4.1). Cette conjugaison est possible directement sur les molécules mères, *e.g.* les chloro-s-triazines (Hatzios 2000, Sulmon et al. 2004) et les chloroanilines (Schmidt et al. 1995, Brazier et al. 2002, Brazier-Hicks and Edwards 2005), et sur les métabolites issus de la phase I, i.e. le pentachlorophénol (Casida 1973, Sandermann 1994, Komossa and Sandermann 1995), les trichlorophénols (Brazier et al.

2002, Brazier-Hicks and Edwards 2005), le dichlorophénol (Gallandt and Balke 1995), le chlorophénol (Fujisawa et al. 2010) et le DDA (2,2-bis-(4-chlorophenyl)-acetic acid), métabolite de phase I du DDT ; (Chaudhry et al., 2002) (**Fig 22**).

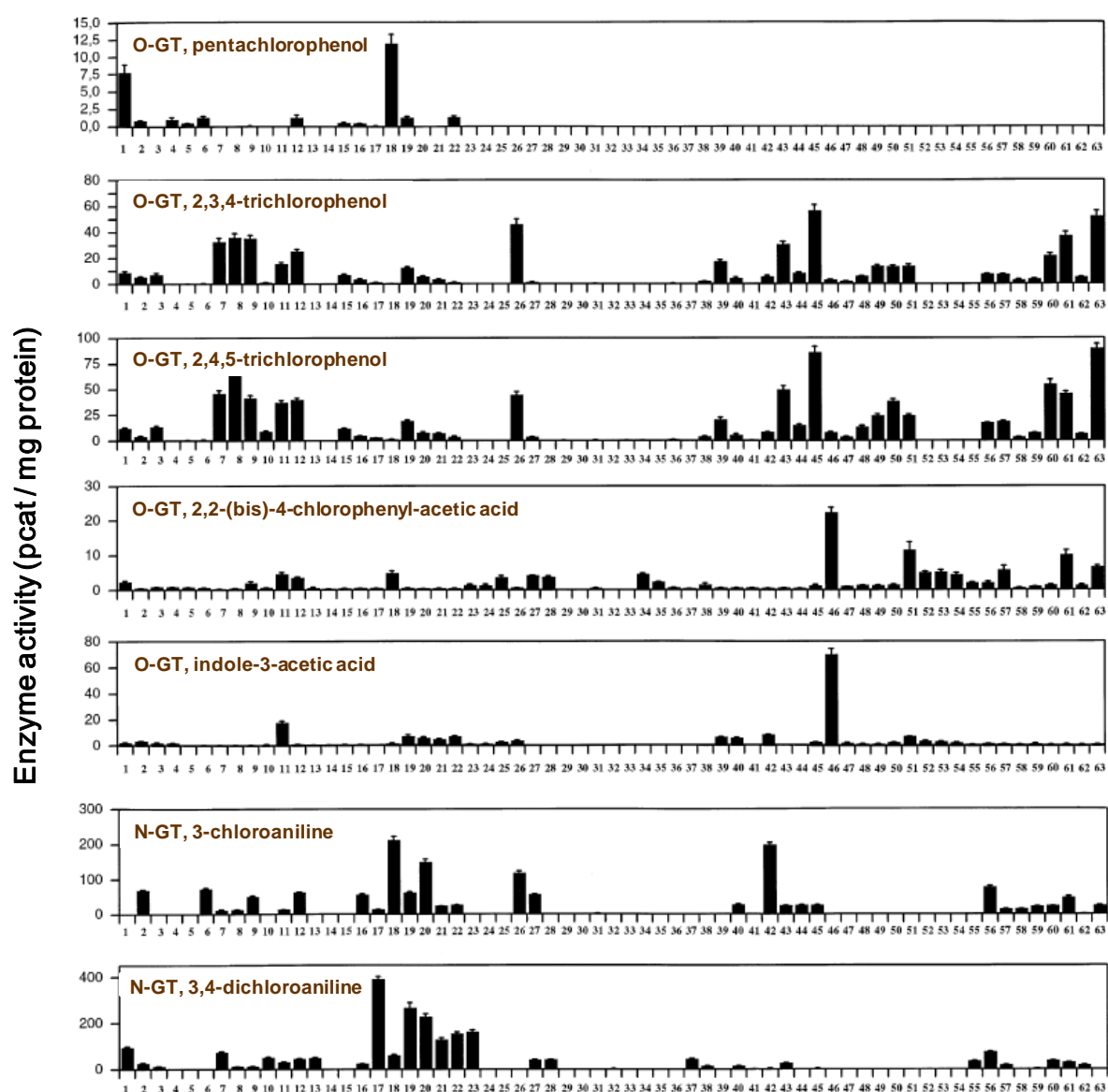


Figure 22 : Activités (pkat/mg protein) des enzymes O-GT et N-GT avec les substrats indiqués. En abscisse sont indiquées les différentes suspensions cellulaires ainsi que les espèces végétales intactes. Les cultures cellulaires ; 1 : *Glycine max* ; 2: *Triticum aestivum*.; 3: *Zea mays* ; 4: *Picea abies*. Plantes intactes ; 5 : *Rosa canina* ; 6 : *Helianthus giganteus* ; 7 : *Salicornia europaea*; 8 : *Lemna minor* ; 9 : *Gingko biloba* ; 10: *Rhus typhina* ; 11: *Sequoiadendron giganteum* ; 12: *Cycas revoluta* ; 13: *Athyrium filix-femina*; 14: *Blechnum spicant*; 15: *Azolla filiculoides* ; 16: *Selaginella lepidophylla* ; 17: *Psilotum nudum* ; 18: *Lycopodium annotinum* ; 19: *Equisetum hyemale* ; 20: *Equisetum arvense*; 21: *Equisetum telmateia* ; 22: *Equisetum giganteum* ; 23: *plagomnium undulatum*; 24: *Polytrichum formosum*; 25: *Sphagnum capillifolium* ; 26: *Fontinalis antipyretica*; 27: *Marchantia polymorpha*; 28: *Conocephalum conicum* ; 29: *Sarcodon imbricatum*; 30: *Lactarius deterrimus* ; 31: *Phanerochaete chrysosporium*; 32: *Alectoria samentosa*; 33: *Peltigera aphtosa*; 34: *Zygmene sp.* ; 35: *Chlorella fusca* ; 36: *Chara Corallina* ; 37: *Caulerpa Mexicana*; 38: *Ulva lactic*; 39: *Enteromorpha compressa*; 40: *Enteromorpha bulbosa*; 41: *Cladophora rupestris*; 42 : *Halimeda opuntia*; 43 : *Acrosiphonia sonderi*; 44 : *Lambia Antarctica*; 45: *Monostroma arcticum* ; 46: *Ascomyllum nodosum*; 47:

Cytoseira baccata; 48: *Laminaria digitata*; 49: *Laminaria hyperborea*; 50: *Laminaria saccharina*; 51: *Halydris siliquosa*; 52: *Fucus vesiculosus*; 53: *Fucus serratus*; 54: *Fucus spiralis*; 55: *Delesseria sanguinea*; 56: *Chondrus crispus*; 57: *Plocamium cartilagineum*; 58: *Porphyra umbilicalis*; 59: *Cystoclonium purpureum*; 60: *Iridaea cordata*; 61: *Palmaria decipiens*; 62: *Pantoneura plocamioides*; 63: *Polysiphonia urceolata*.

Dans l'étude de Pflugmacher et Sandermann (1998), il a été démontré que de nombreuses plantes aquatiques telles que *Lemna minor* ou les macroalgues marines possédaient une forte activité glycosyltransférase sur des xénobiotiques organochlorés. Les GTs catalysent le transfert d'un monosaccharide à partir d'un donneur de sucre activé, sur une large gamme de molécules accepteurs, allant des phytohormones, des métabolites secondaires biotiques et abiotiques, aux toxines environnementales (Gibson 2004, Bowles et al. 2006, Lairson et al. 2008, Osmani et al. 2009, Wang 2009) (**Fig 23**). La glycosylation est un mécanisme important de régulation du métabolisme cellulaire en améliorant la solubilité des produits, leur stabilité et en facilitant leur stockage dans les cellules de la plante (Jones and Vogt 2001, Bowles et al. 2005). Deux types de conjugaison peuvent se produire, soit la O-glycosylation nécessitant la présence d'un -OH sur le xénobiotique (ex: OH-dichlofop, métabolite du dichlofop), soit la N-glycosylation qui se produit en général sur un groupement -NH₂ libre (ex: chlorambène) (Tissut et al. 2006).

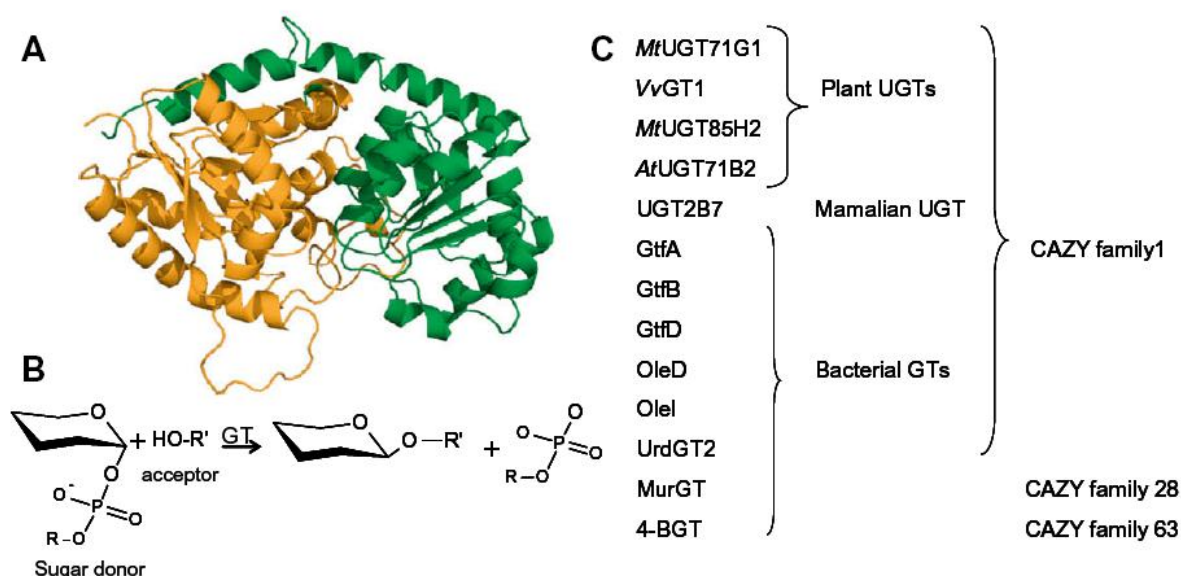


Figure 23 : Caractéristiques d'une glycosyltransférase appartenant au clan II. A : Diagramme en ruban (structure en 3D) d'une GT adoptant le repli GT-B. Le domaine N-terminal est représenté en orange, le domaine C-terminal en vert. B : Réaction catalysée par les GTs. C : liste des inversions des replis GT-B, avec structure en cristal disponible. Ceux-ci seront mentionnés dans l'analyse des structures en cristal d'UGT de plante (Osmani et al. 2009).

Les réactions de catalyse des GTs sont cytosoliques et les produits formés accèdent aux systèmes de transport membranaire qui reconnaissent les résidus glucosylés (Lim and Bowles 2004). Les GTs sont codées par de multiples gènes et des études très récentes, ont pu identifier et lister par exemple chez deux espèces de plantes, 456 gènes GTs chez *Arabidopsis thaliana* et 570 chez *Oryza sativa* sp. *Japonica* (Coutinho et al. 2003). Il existe au total, 92 familles de GTs classées hiérarchiquement suivant leurs structures en 3D (GT-A, GT-B, GT-C et GT-D) et leur mécanisme (Campbell et al. 1997, Coutinho et al. 2003). Néanmoins la famille la plus représentée chez les plantes est la famille 1 (GT1) appelé plus communément uridinediphosphate-glucose (UDP-glc) glycosyltransférases (UGTs) qui catalysent le transfert de groupements glucosylés (Ross et al. 2001) sur un large éventail de petites molécules telles que les terpénoïdes, les alcaloïdes, les glycosides cyanogéniques, les glycosinolases et les xénobiotiques (Osmani et al. 2009).

Ces dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans l'étude structurale des UGTs, faisant progresser nos connaissances sur les mécanismes de glycosylation et en ingénierie sur les différents schémas de glycosylation possibles dans le but de produire des glycosides bioactifs (Wang 2009).

Les structures en cristal de 5 UGTs de plantes (*Medicago truncatula*) UGT71G1 (Shao et al. 2005), UGT85H2 (Li et al. 2007) et UGT78G1 (Modolo et al. 2009) ; *Vitis vinifera* VvGT1 (Offen et al. 2006) et *Arabidopsis thaliana* UGT72B1 (Brazier-Hicks et al. 2007) ont été décrites montrant une diversité structurale réduite. Les structures de ces UGTs possèdent toutes le même repliement GT-B, que l'on retrouve généralement dans la superfamille des enzymes GTs (Bourne and Henrissat 2001, Coutinho et al. 2003) et qui possède deux domaines N- et C-terminaux avec un « Pli de Rossmann » identique.

6. Rôle des microorganismes associés aux plantes

6.1 La Rhizosphère, un lieu d'échange et d'interactions plante/bactéries

Le terme rhizosphère a été défini par Hiltner (1904) pour décrire la stimulation de la biomasse microbienne dans la région du sol située à l'interface sol/racines (Hartmann et al., 2008). Aujourd'hui, ce terme rhizosphère correspond à une définition plus générale : *'c'est le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire'* (Darrah 1993). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, la densité du système racinaire et ses propriétés de surface et les propriétés physico-chimiques du sol (Abhilash and Singh 2009). Pour les éléments peu mobiles, la rhizosphère se limite au(x) premier(s) millimètre(s) de sol situé(s) autour des racines (Hinsinger 1998, Hinsinger et al. 2009). Ce volume de sol associé aux racines végétales contient de nombreux microorganismes (bactéries et champignons) qui interagissent avec la plante de façon altruiste : (i) les racines libèrent des sucres facilement assimilables (exsudats racinaires) et créent des espaces dans le sol facilitant les mouvements de fluides (O_2 et H_2O) ce qui permet aux microorganismes de trouver des conditions optimales pour leur développement et (ii) les microorganismes rendent disponibles pour la plante les nutriments minéraux (par minéralisation de la matière organique du sol) et assurent un maintien qualitatif des propriétés physico-chimiques du milieu (pH, qualité du gaz (CO_2/O_2) du sol,...) (Abhilash and Singh 2009, Ferro et al. 1999) (**Fig 24**). Par ailleurs, la flore microbienne confère à la plante des effets bénéfiques sur la réduction d'apparition de maladies potentielles, causées par des pathogènes fongiques, bactériens, viraux et contre certains prédateurs (nématodes) (Kloepper et al. 2004).

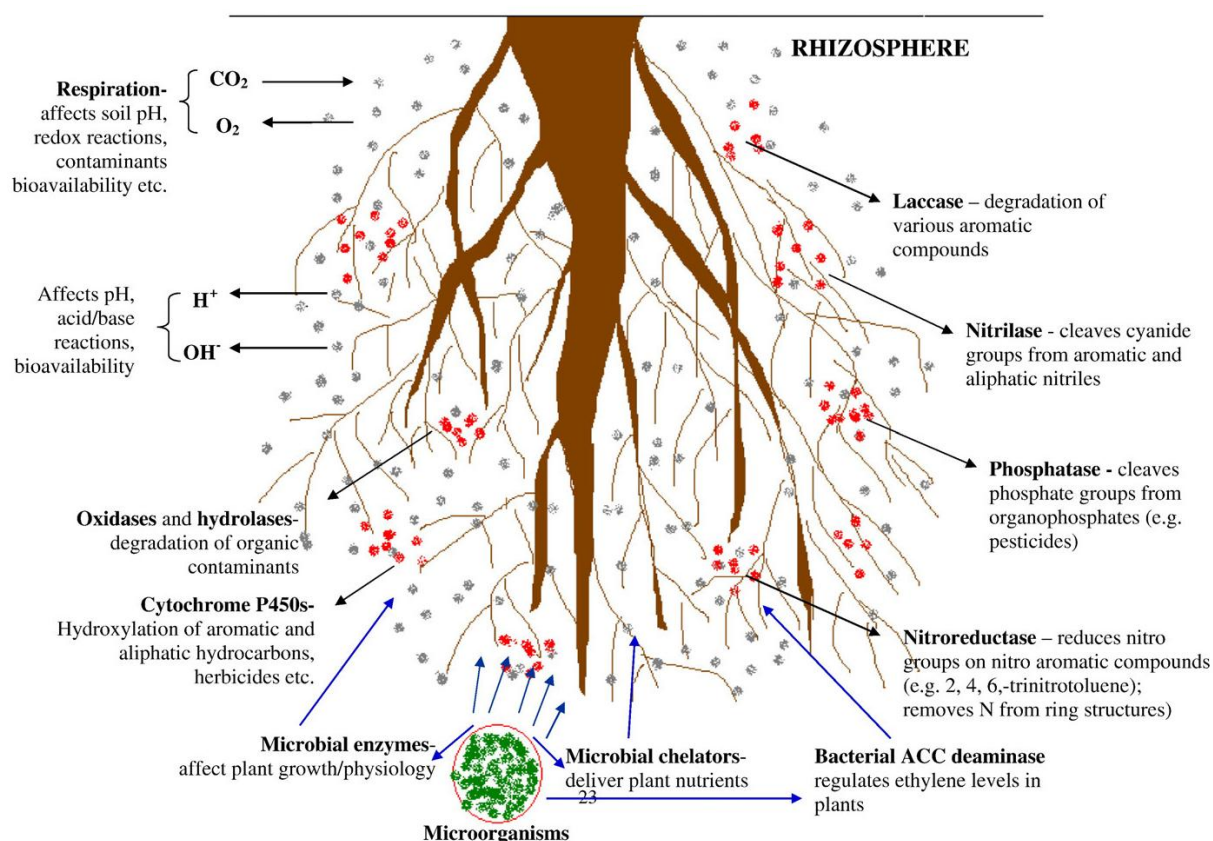


Figure 24: Représentation schématique des activités enzymatiques microbiennes de la zone rhizosphérique (Abhilash and Singh 2009).

La rhizosphère peut jouer un rôle essentiel dans l'efficacité de la remédiation de matrices (sols, sédiments, eaux) polluées par des métaux ou des molécules organiques de synthèse (Mench et al. 1988, Hinsinger 2001, Schwitzguebel et al. 2009). Les activités de la microflore peuvent libérer dans la rhizosphère des protons et/ou anions qui peuvent moduler localement les propriétés chimiques du sol et libérer des chélatants, ensemble d'éléments qui peuvent faciliter la phytoextraction ou encore favoriser la phytostabilisation (Abhilash and Singh 2009) (**Fig 24**).

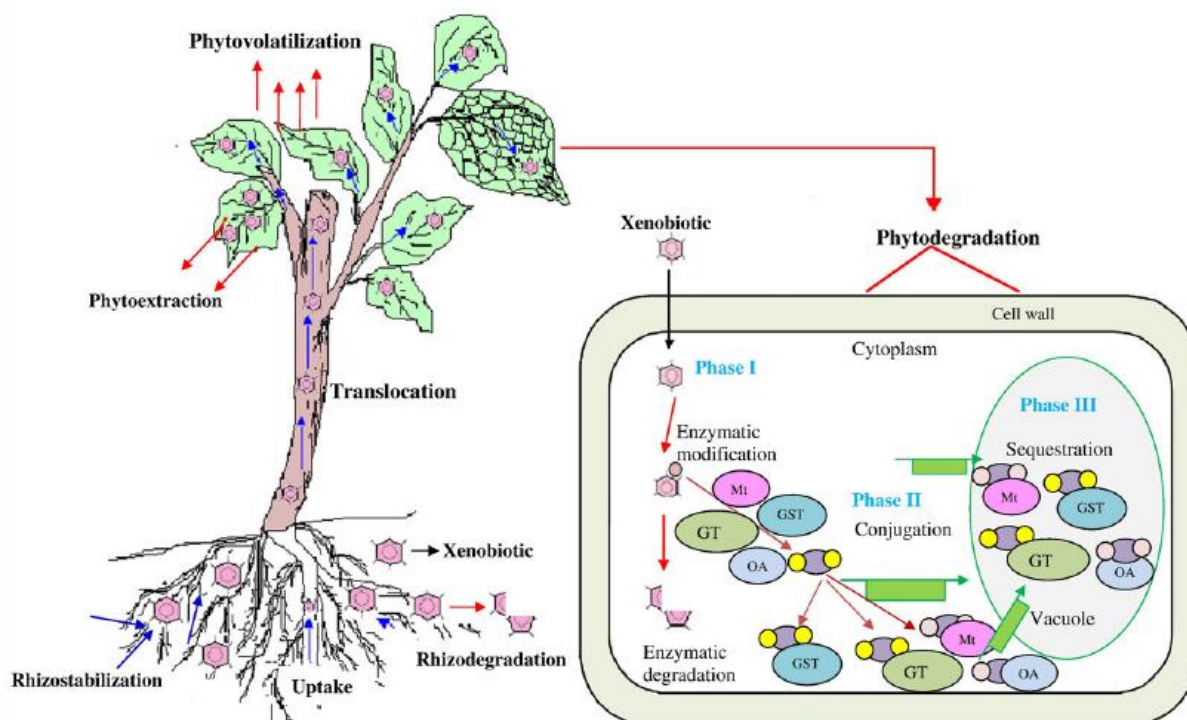


Figure 25 : Représentation des voies de détoxification des xénobiotiques dans un scénario de phytoremédiation. Les xénobiotiques peuvent être stabilisés ou dégradés dans la rhizosphère (voie microbienne), adsorbés ou accumulés dans les racines et transportés vers les parties aériennes, volatilisés ou dégradés au sein des tissus de la plante. La détoxification des plantes implique généralement la modification par conversion enzymatique (phase I) suivie d'une conjugaison (phase II), suivi par la séquestration active (phase III). Les transporteurs actifs sont indiqués en vert. GST= glutathion-S-transférases ; GT= glycosyltransférases ; Mt : Malonyltransférases ; OA= acides organiques (Newman and Reynolds 2004, Pilon-Smits 2005).

La rhizosphère est aussi le lieu d'activités biochimiques intenses en raison de la stimulation de la microflore par le flux de carbone exsudé par les racines (phytostimulation) (Abhilash and Singh 2009, Newman and Reynolds 2004, Pilon-Smits 2005) (**Fig 25**). La rhizodégradation est un mécanisme dominant dans l'élimination des molécules organiques réalisée par la microflore rhizosphérique qui possède des capacités métaboliques importantes, i.e. laccases (rupture de cycle aromatique, (Novotny et al. 1997), nitrilases (coupure de groupements cyanide (Susarla et al. 2002, Kaplan et al. 2006), phosphatases (coupure de groupement phosphate comme dans le cas des insecticides organophosphates (Susarla et al. 2002), nitroréductases (réduction de groupement nitro comme dans les nitrobenzenes (Susarla et al. 2002, Caballero et al. 2005, Liu et al. 2007) monooxygénases P450 (oxydation de polluants divers (Sandermann 1992, Urlacher et al. 2004, McLean et al. 2005) oxydases et hydrolases diverses (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Enzymes de plantes et de la microflore jouant un rôle dans la dégradation de composés organiques. Les espèces bactériennes sont désignées par un (B) et les espèces fongiques par un (F) (Gerhardt et al. 2008)

Enzyme family	Catalytic action	Examples
Various plant enzymes for uptake, transport, sequestration and degradation Dehalogenase	General uptake and degradation Hydrolyzes chlorine and fluorine from halogenated aliphatic hydrocarbons (e.g., trichloroethylene) and aromatic hydrocarbons (e.g., PCBs, DDT)	All plants <i>Xanthobacter autotrophicus</i> (B) Hybrid poplar (<i>Populus</i> spp.) <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> (B)
Laccase	Degradation of various aromatic compounds	<i>Alfalfa</i> (<i>Medicago sativa</i>) <i>Trametes versicolor</i> (F) <i>Coriolopsis polyzona</i> (F)
Dioxygenase	Degradation of various aromatic compounds	<i>Pseudomonas</i> sp. (B) <i>Mycobacterium</i> sp. (B)
Peroxidase	Degradation of various aromatic compounds; reductive dehalogenation of aliphatic hydrocarbons	Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) <i>Phanerochaete chrysosporidium</i> (F) <i>Phanerochaete laevis</i> (F) <i>Alfalfa</i> (<i>Medicago sativa</i>)
Nitrilase	Cleaves cyanide groups from aromatic and aliphatic nitriles	Willow (<i>Salix</i> spp.) <i>Aspergillus niger</i> (F)
Nitroreductase	Reduces nitro groups on nitroaromatic compounds (e.g., 2,4,6-trinitrotoluene); removes N from ring structures	<i>Comamonas</i> sp. (B) <i>Pseudomonas putida</i> (B) Hybrid poplar (<i>Populus</i> spp.)
Phosphatase	Cleaves phosphate groups from organophosphates (e.g., pesticides)	Giant duckweed (<i>Spirodela polyrrhiza</i>)
Cytochrome P450 monooxygenase	Hydroxylation of aromatic and aliphatic hydrocarbons	Most aerobic bacteria, all fungi and all plants

La rhizodégradation est efficace dans l'élimination des hydrocarbures au niveau de la rhizosphère de racines profondes de certaines espèces d'arbres (Carman et al. 1998), ainsi que d'autres espèces végétales annuelles (Schwab and Banks 1994). Des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de *Withania somnifera*, *Solanum torvum*, *Erianthus munja* et *Lantana camara* sont capables de biodégrader le lindane (Abhilash and Singh 2010). Par ailleurs, il a été démontré que les flavonoïdes et autres composés libérés par les racines des plantes, pouvaient stimuler la croissance et l'activité biodégradante des bactéries de la rhizosphère, vis-à-vis de molécules organiques récalcitrantes telles que les PCBs ou les HAPs (Chaudhry et al. 2005, Ferro et al. 1999, Leigh et al. 2002, Corgie et al. 2004, Leigh et al. 2006). De plus, la croissance et la mort des racines favorisent l'aération du sol, ce qui peut accroître la dégradation par oxydation chimique de ces composés organiques (Leigh et al. 2002, Kuiper et al. 2004). Certaines espèces végétales semblent favoriser le développement des communautés microbiennes jouant un rôle de dégradation dans un grand volume de sol qui s'étend au-delà de la rhizosphère (Siciliano et al. 2003, Leigh et al. 2006). C'est le cas observé chez certaines espèces d'arbres : *Pinus nigra*, *Fraxinus excelsior*, *Betula pendula*, *Salix caprea*, *Robinia pseudoacacia* ; et de poacées : *Agropyron repens*, *Agrostis alba*, *Calamagrostis*

epigeois et *Lolium perenne* (Leigh et al. 2006) mais également d'espèces aquatiques comme les macrophytes (Jouanneau et al. 2005, Lin and Mendelssohn 2009, Toyama et al. 2009, Yan et al. 2011). Ces espèces végétales sont par conséquent largement utilisées dans les procédés de phytoremédiation.

Ainsi, associer une activité de biodégradation au niveau de la rhizosphère (milieu anaérobiose ou aérobie) à une activité de phytoremédiation (phytoextraction + phytodégradation) par capture de molécules générées au niveau rhizosphérique semble un axe d'expérimentation porteur d'avenir en situation réelle d'écoremédiation des milieux chimiquement dégradés (Abhilash and Singh 2009, Tissut et al. 2006, Van Aken and Doty 2010).

6.2 Biodégradation des OCs dans les sols

6.2.1 Métabolisation du lindane

De nombreuses études ont été menées pour comprendre les voies de biodégradation (bactérienne/fongique) du lindane et de ses isomères au niveau des sols, en aérobie ou anaérobiose (Deo et al. 1994, Phillips et al. 2005, Bhatt et al. 2009) (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Liste des microorganismes impliqués dans la biodégradation des HCHs (Phillips et al. 2005).

Microorganism	HCH degradation characteristics
<u>Bacteria</u>	<u>Aerobic degradation</u>
<i>Bacillus</i> sp.	Dechlorination ^a (γ -HCH)
Cyanobacteria: <i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120, and <i>Nostoc ellipsoforum</i>	Dechlorination (γ -HCH)
<i>Escherichia coli</i>	Dechlorination (γ -HCH)
<i>Pandoraea</i> sp.	Utilized as sole carbon source (γ -HCH); Dechlorination (α -HCH)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Dechlorination (γ -HCH)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Mineralization ^b (α -, β - and γ -HCH); Dechlorination (δ -HCH)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Dechlorination (γ -HCH)
<i>Pseudomonas putida</i>	Dechlorination (γ -HCH); Isomerization of γ -HCH to α -HCH
<i>Pseudomonas vesicularis</i> P59	Mineralization (α -HCH)
<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	Dechlorination (α - and γ -HCH)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> B90	Utilized as sole carbon source (α -, β -, δ - and γ -HCH); implies mineralization.
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> UT26	Mineralization (γ -HCH); Dechlorination (α - and δ -HCH)
	<u>Anaerobic degradation</u>
<i>Citrobacter freundii</i>	Dechlorination (γ -HCH)
<i>Clostridium rectum</i> S-17	Dechlorination (γ -HCH)
<i>Clostridium sphenoides</i> UQM780	Utilized as sole carbon source (α -, β -, δ - and γ -HCH)
<i>Desulfovibrio</i> sp.	Dechlorination (γ -HCH)
<u>Fungi</u>	
<i>Cyathus bulleri</i>	Aerobic dechlorination (γ -HCH)
DSPM95	Aerobic dechlorination (γ -HCH)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	Aerobic mineralization (γ -HCH)
<i>Phanerochaete sordida</i>	Aerobic dechlorination (γ -HCH)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Aerobic dechlorination (γ -HCH)
<i>Pleurotus florida</i>	Aerobic dechlorination (γ -HCH)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Aerobic dechlorination (γ -HCH)
<i>Trametes hirsutus</i>	Aerobic dechlorination (γ -HCH)

^aDéchloration : dégradation du HCH mesurée, cependant la minéralisation est soit non testée soit non détectée.

^bMinéralisation : complète dégradation avec libération de CO₂ détecté par traçage radioactif

Le lindane semble être efficacement biodégradé par les genres bactériens tels que les *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Clostridium* (Phillips et al. 2005). Ces genres bactériens sont retrouvés dans la rhizosphère de nombreuses espèces végétales et sont très bien adaptés aux stress chimiques (Mazzola 1999, Mazzola and Gu 2000).

La biodégradation du lindane peut s'effectuer en anaérobiose ou aérobiose (Lal et al. 2010). La voie de biodégradation en aérobiose (**Fig 26**) peut être résumée de la manière suivante : HCH \rightarrow pentachlorocyclohexène \rightarrow tétrachlorocyclohexadiène \rightarrow 1,2,3-trichlorobenzène (TCB) and 1,2,4-TCB \rightarrow dichlorobenzène (DCB) (Fathepure et al. 1987, Adrian et al. 2000) (Rodriguez-Garrido et al. 2004, Phillips et al. 2005, Quintero et al. 2005). Les dérivés chlorobenzènes (CBs) sont générés par des activités enzymatiques de type déhalogénase et les TCB et DCB sont les congénères les plus fréquemment détectés. Ces dérivés CBs sont ensuite dégradés par des hydrolases conduisant à la formation de métabolites chloro_n-phenol. En anaérobiose, la voie principale de déhalogénéation du lindane est : HCH \rightarrow tetrachlorocyclohexène \rightarrow dichlorocyclohexadiène \rightarrow monochlorobenzène (MCB) (Ricking and Schwarzbauer 2008, Lal et al. 2010). Ces cascades de réactions enzymatiques produisent des métabolites intermédiaires stables (CBs, TCB, DCB, MCB) mais peuvent conduire dans certains cas à une ouverture de cycle puis à une minéralisation complète (Nagata et al. 1999, Ricking and Schwarzbauer 2008).

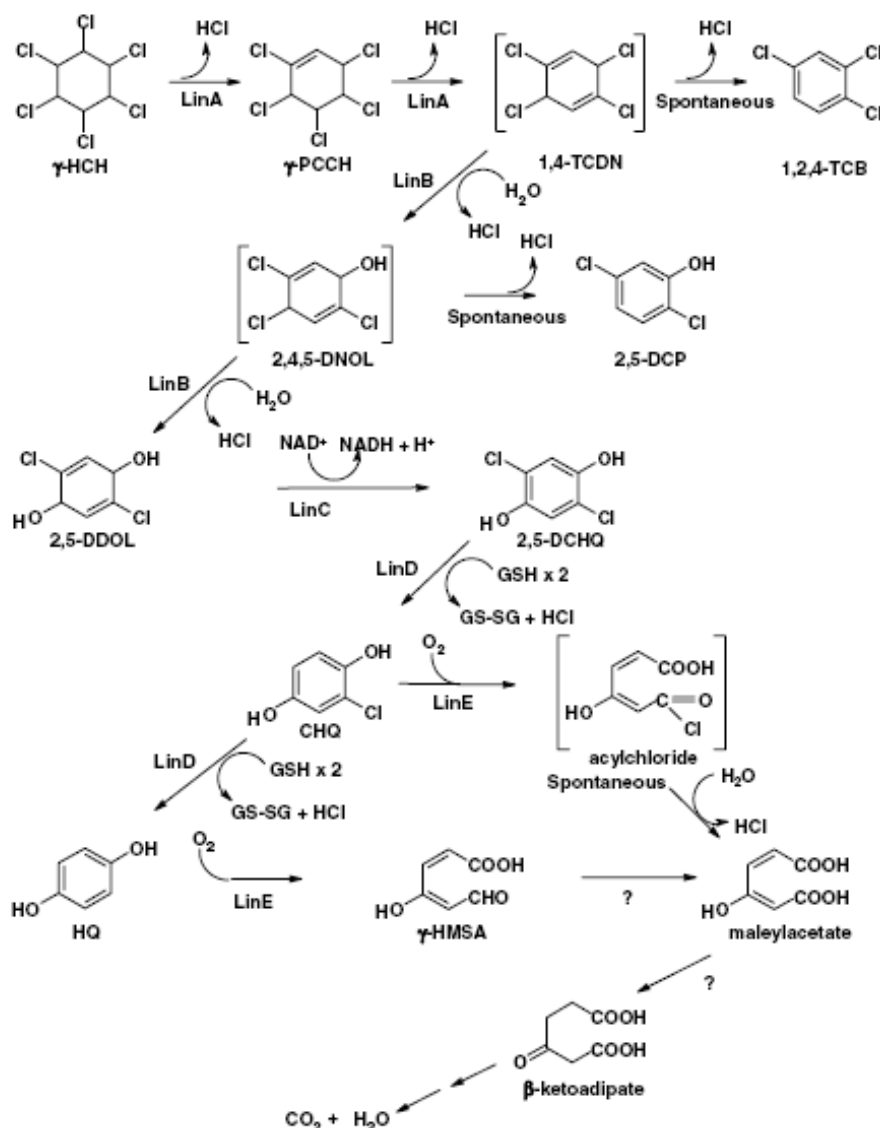


Figure 26 : Voie de dégradation en aérobie du γ -HCH par *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

HCH : Hexachlorocyclohexane, PCCH : pentachlorohexane, 1,4-TCDN : 1,3,4,6-tétrachloro-1,4-cyclohexadiène, 1,2,4-TCB : 1,2,4-trichlorobenzène, 2,4,5-DNOL : 2,4,5-trichloro-2,5-cyclohexadiène-1-ol, 2,5-DCP : 2,5-dichlorophénol, 2,5-DDOL : 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiène-1,4-diol, 2,5-DCHQ : 2,5-dichlorohydroquinone, CHQ : chlorohydroquinone, HQ : Hydroquinone, HMSA : Hydroxymuconic semialdehyde, GSH : Glutathion réduit, Lin A : γ -HCH déhydrochlorinase, Lin B : 1,4-TCDN halidohydrolase, Lin C : 2,5-DDOL déshydrogénase, LinD : 2,5-DCHQ déhalogénase réductive, Lin E : CHQ dioxygénase. (Rodriguez-Garrido et al. 2004, Phillips et al. 2005, Quintero et al. 2005).

6.2.2 Métabolisation des chlorobenzènes

Les CBs sont sujets à des dégradations possibles par les microorganismes présents dans le sol (Mars et al. 1997, Sommer and Gorisch 1997, van der Meer et al. 1998, Pollmann et al. 2001, Vlieg and Janssen 2001) en aérobiose (Nishino et al. 1992, Brunsbach and Reineke 1994, Mars et al. 1997) et en anaérobiose (Holliger et al. 1992, Alfreider et al. 2003). En conditions d'aérobiose, des espèces bactériennes sont capables de se développer et de biodégrader les CBs telles que *Pseudomonas sp.*, *Xanthobacter sp.* et *Alcaligenes sp.* (Fritz et al. 1991, Nishino et al. 1992, Spain and Nishino 1987, Oltmanns et al. 1988, Sommer and Gorisch 1997, Adebuseye et al. 2007). Les voies de biodégradation des CBs sont décrites dans les **figures 27, 28 et 29**.

Le TCB est en partie dégradé en DCB et MCB (par des déhalogénations successives), métabolites relativement stables, et en partie minéralisé par des oxydations et des déhydrogénations successives conduisant à l'ouverture du cycle aromatique (Chambers et al. 1963, Malaney and McKinney 1966).

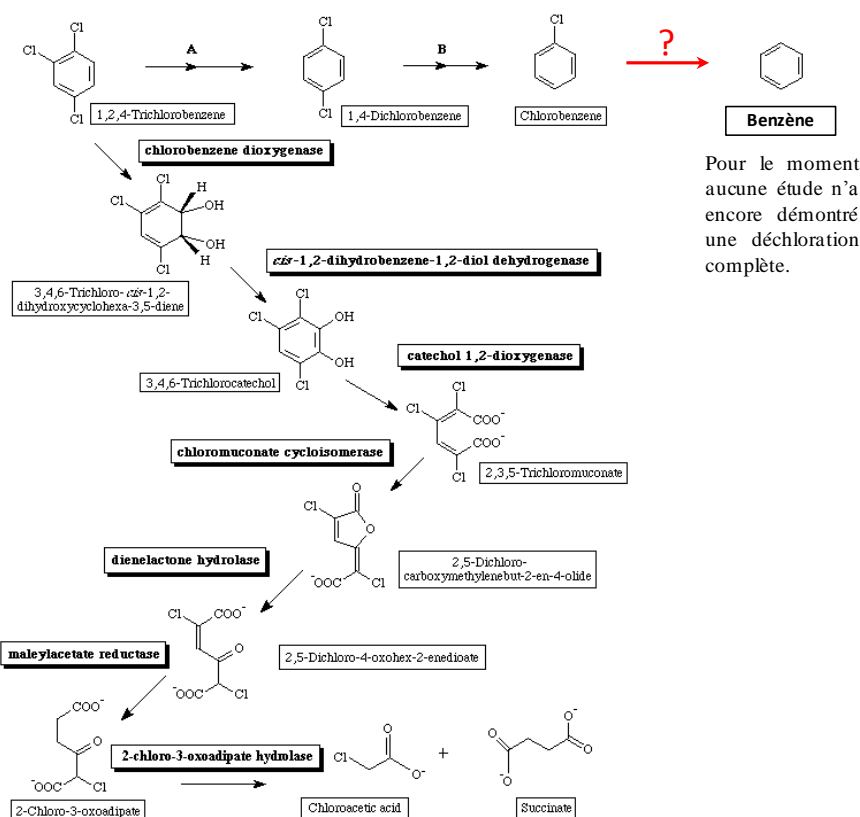


Figure 27 : Voie de dégradation du 1,2,4-TCB chez la bactérie *Burkholderia sp.* D'après Guang, 2007.

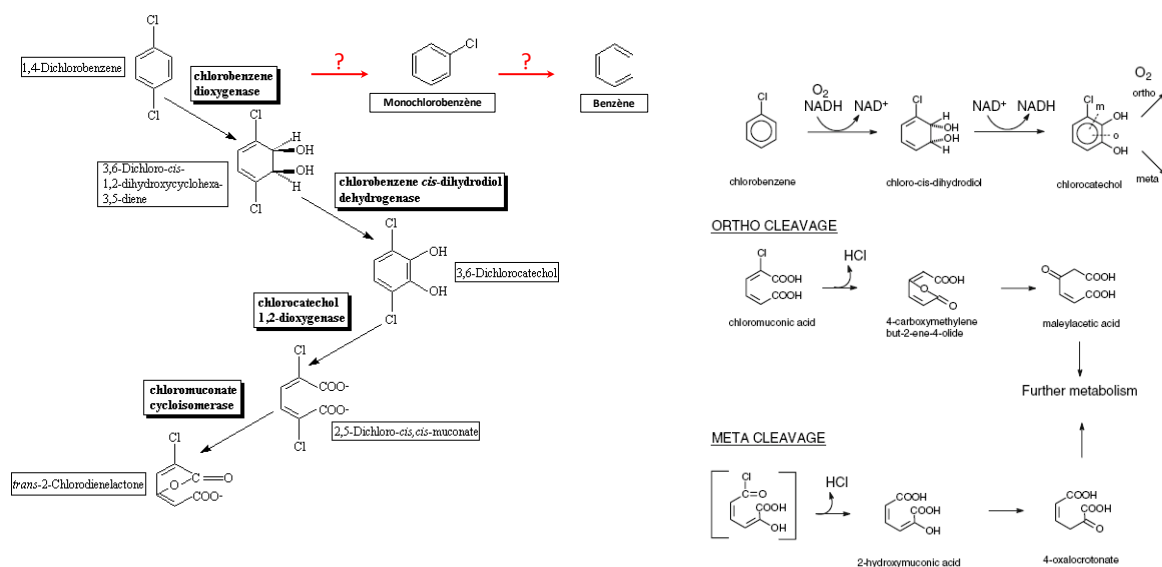


Figure 28 : Voie de dégradation du 1,4-DCB chez la bactérie *Pseudomonas sp.* D'après Jiangbi, 2006.

Figure 29 : Voies de dégradation aérobie du MCB par des souches bactériennes (Reineke and Knackmuss 1984)

Les voies de biodégradation du DCB et MCB sont très similaires avec (i) une voie de déchloration conduisant à des dérivés CBs dont le degré de chloration diminue et (ii) une voie d'ouverture du cycle aromatique grâce à l'action d'enzymes de type

oxygénases, dehydrogénases, cycloisomérases (**Fig 29**) (Bartels et al. 1984, Mars et al. 1997).

7. Objectifs de l'étude

Le projet "Valorsites" (sous-projet "Phyco") dans lequel s'inscrit ce travail, est labellisé par le Pôle de compétitivité Chimie Environnement Axelera (2007-2010, reconduit jusqu'en 2011). La thématique de recherche concerne les possibilités d'éco-remédiation d'espaces contaminés de manière diffuse par les composés aromatiques. Face à des situations environnementales contaminées par les OCs (Lee et al. 2000, Meharg et al. 2000, Miglioranza et al. 2003, Marvin et al. 2004, Ricking and Schwarzbauer 2008, Abhilash and Singh 2009, Sun et al. 2010, Turgut et al. 2010) diverses techniques de remédiation ont fait l'objet d'études *in situ* parmi lesquelles les processus de phytoremédiation en zones humides (Pardue et al. 1993, Leppich et al. 2000, Lee et al. 2003, Keefe et al. 2004, Imfeld et al. 2009). Ces études ont démontré que le système le plus approprié pour répondre correctement à un processus de traitement de la pollution de type OCs correspond à une zone humide à écoulement subsurfacique (SSFW, SubSurface Flow Wetland) (Ma and Burken 2002, Braeckevelt et al. 2008, Marco-Urrea et al. 2009, Braeckevelt et al. 2007, Imfeld et al. 2009). Effectivement, les CBs et les isomères HCHs sont classés respectivement comme molécules volatiles ($>5.10^{-3}$ Pa) et semi-volatiles (10^{-6} – 5.10^{-3} Pa). Par conséquent, afin d'éviter une contamination de l'atmosphère par volatilisation des OCs, il est recommandé d'infiltrer l'eau contaminée dans le substrat de la zone humide afin que l'eau circule sous la surface du substrat et qu'elle soit en contact avec la matière organique du substrat (**Fig 30**). Dans ces conditions, les OCs sont significativement adsorbés sur les matrices organiques (Lee et al. 2003, MacLeod 1999) limitant les pertes par volatilisation.

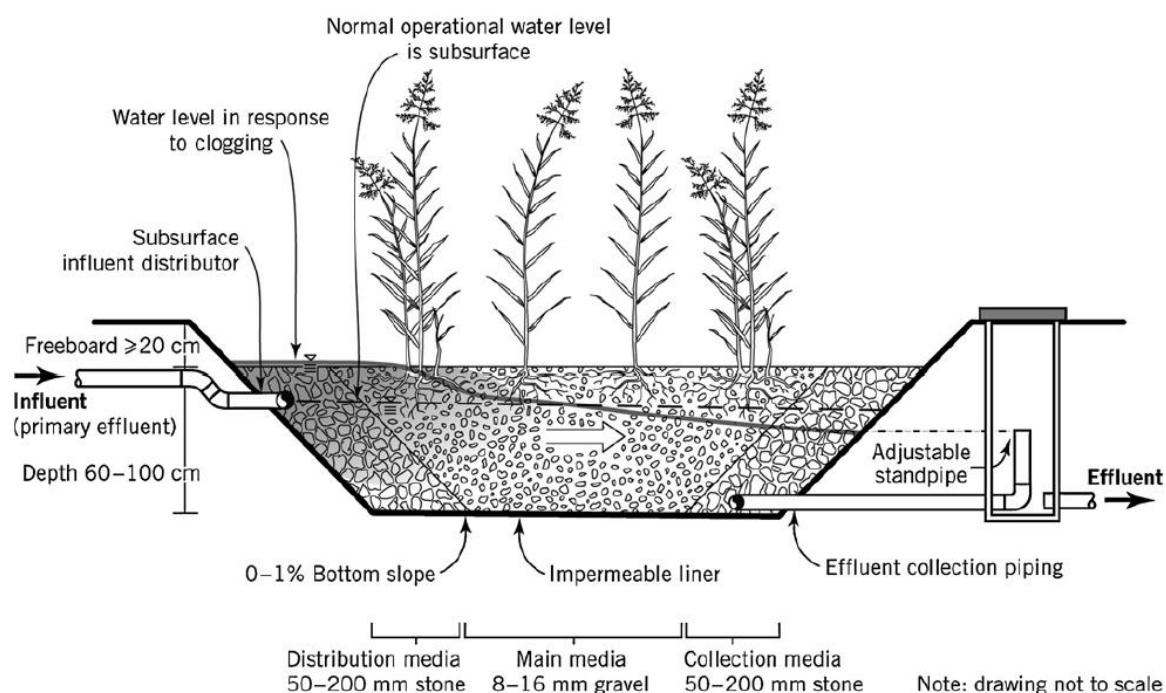


Figure 30 : Schéma de l'organisation classique d'une zone humide à écoulement subsurfacique (SSFWS, SubSurface Flow Wetland) d'après (Knowles et al. 2011).

Bien que la phytoremédiation des OCs soit de plus en plus étudiée (Williams 2002, Haberl et al., 2003, Ma and Burken 2003, Keefe et al. 2004) les mécanismes physiques, chimiques et biologiques mis en jeu au sein des SSFW restent encore peu élucidés. Kumar et Zhao (2011) parlent de 'Black Box'. L'objectif de mon travail de recherche réalisé au LECA consiste à analyser les mécanismes impliqués dans ces stratégies de remédiation spécifiquement au niveau du couvert végétal. Il s'agit d'évaluer et d'expliquer les processus de phytotolérance, de phytoextraction et de rhizoremédiation impliquée dans la remédiation des OCs.

Un des premiers critères indispensables au choix d'une plante pour son utilisation en phytoremédiation, repose sur sa capacité à s'adapter et à survivre à des conditions de pollutions d'origine anthropique. La plante sélectionnée doit pouvoir si possible, présenter un bon compromis des qualités suivantes (Chaudhry et al. 2002) :

- être hypertolérante aux concentrations en polluants,
- être hyperaccumulatrice,
- avoir un système foliaire et racinaire développé (transpiration intense),

- avoir une activité de croissance intense,
- permettre une extraction rapide,
- avoir une « machinerie » interne pour métaboliser les polluants,
- être adaptable au climat local,
- avoir une certaine résistance aux parasites et aux maladies,
- permettre une facilité de gestion,
- avoir le temps de végétation annuel le plus long possible,

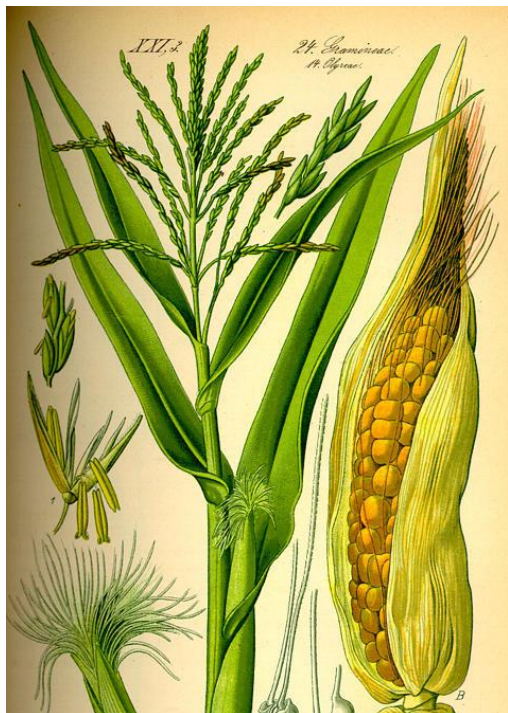
Notre étude des mécanismes physiologiques, biochimiques et adaptatifs impliqués dans ces processus d'éco-remédiation a été réalisée en conditions contrôlées et à l'aide de microcosmes de laboratoire. Pour se faire, des plantes tolérantes aux organochlorés ont été sélectionnées lors d'exposition en milieu hydroponique suivant une gamme de concentration jusqu'à la limite de solubilité de chacune des molécules étudiées (San Miguel 2007). Deux espèces végétales présentent un bon niveau de tolérance à la pression chimique de type OCs : une plante agricole, le maïs (*Zea mays*) et une macrophyte, le roseau (*Phragmites australis*). Ces deux plantes présentent dans la nature une capacité transpiratoire en plein développement de 50 à 70 m³ j⁻¹par hectare (durant environ 100 jours par an).

7.1 Le matériel végétal

7.1.1 Zea mays

Plante tropicale herbacée annuelle de la famille des Poacées, originaire d'Amérique centrale, largement cultivée comme céréale et comme plante fourragère (**Fig 31**). Cette plante est cultivée en agriculture intensive grâce à sa croissance rapide et à son haut rendement (jusqu'à 120 q ha⁻¹ par an pour les graines (Tasli, 1996). D'autre part, cette plante est souvent utilisée en laboratoire pour étudier sa capacité à capturer et à transférer des molécules choisies à partir des substrats contaminés (eau, sable, sol) vers les parties aériennes. Possédant un système foliaire et racinaire important, elle présente une bonne efficacité en phytoextraction de métaux ou de pesticides (Huang et al. 2006, Murakami et al. 2007). Des études ont mis en évidence chez le maïs, une rétention

majoritaire dans les racines des éléments Cd, Cu, Pb et seul le Mn et le Zn sont essentiellement accumulés dans les parties aériennes ; le faible transfert vers le caryopse en fait un matériel pour l'option de phytoexclusion (Mench et al 1989, 1992).



Règne	→	<i>Plantae</i>
Sous-règne	→	<i>Tracheobionta</i>
Division	→	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	→	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	→	<i>Commelinidae</i>
Ordre	→	<i>Cyperales</i>
Famille	→	<i>Poaceae</i>
Sous-famille	→	<i>Panicoideae</i>
Genre	→	<i>Zea</i>
Espèce	→	<i>Zea mays</i>

Figure 31 : Illustration d'un plant de *Zea mays* (Thomé, 1885)

7.1.2 *Phragmites australis*

Le roseau commun ou *Phragmites australis* (**Fig 32**) est une grande plante vivace dressée, qui se développe en colonies denses sur les bords de milieux humides. Elle se propage grâce à des stolons longuement rampants et des rhizomes traçants, mais aussi par graines à dispersion par le vent (CIRAD).

Les plantes adultes de *Phragmites australis* mesurent entre 40 cm et 2 m et peuvent monter jusqu'à 4 m de haut. Les tiges non ligneuses sont robustes droites et sans embranchements. Les grandes feuilles sont larges de 1 à 3 cm. L'inflorescence du *Phragmites australis* est une longue panicule dense de 10 à 30 cm.

De nos jours, l'utilisation de *P. australis* dans des bassins filtrants pour l'épuration des eaux souillées, est une technique qui se développe largement. Ces plantes ont la particularité d'être tolérantes aux polluants et capables de les dégrader (Arienzo et al. 2009).

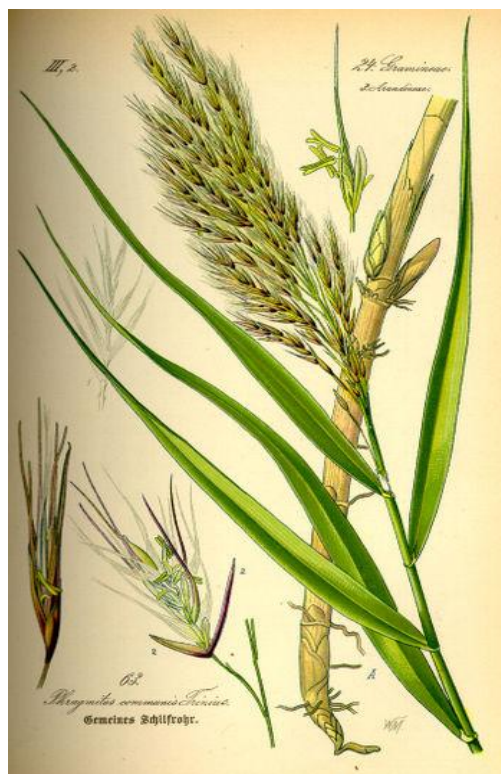


Figure 32 : Illustration de *Phragmites australis* (Thomé, 1885)

Règne	→	<i>Plantae</i>
Sous-règne	→	<i>Tracheobionta</i>
Division	→	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	→	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	→	<i>Commelinidae</i>
Ordre	→	<i>Cyperales</i>
Famille	→	<i>Poaceae</i>
Sous-famille	→	<i>Arundinoideae</i>
Genre	→	<i>Phragmites</i>
Espèce	→	<i>Phragmites australis</i>

7.2 Plan de l'étude doctorale

Chapitre I : Evaluation de la phytotoxicité des OCs sur *Z. mays* et *P. australis*

Une plante montrant une efficacité optimale en phytoremédiation ne doit pas être affectée par les doses environnementales de pollution (Baker et al. 2000, Sulmon et al. 2007). Partant de ce postulat, des tests d'évaluation de la phytotoxicité des OCs sur les deux plantes modèles ; ont été réalisés. Les critères comme la morphologie, la biomasse, le taux de chlorophylle, la mortalité cellulaire et le stress oxydatif ont été pris en compte et mesurés. Les résultats obtenus ont permis d'évaluer les concentrations maximales ne provoquant pas d'effets phytotoxiques (NOEC) pour chacune des quatre molécules (MCB, DCB, TCB, γ -HCH) et pour le mélange de ces quatre molécules.

Publication 1 : Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes (p.10)

Angélique San Miguel, Mathieu Faure, Patrick Ravanel, Muriel Raveton

In press Ecotoxicology

Participation : encadrement et réalisation technique, analyses des résultats, aide à l'écriture.

Publication 2 : *Phragmites australis* dose-responses to organochlorines

Faure Mathieu, Angélique San Miguel, Patrick Ravanel, Muriel Raveton

Soumise à Chemosphere

Participation : encadrement et réalisation technique, analyses des résultats, réalisation des figures.

Chapitre II : Phytoextraction des OCs par *P. australis*

Les techniques de phytoremédiation les plus efficaces et/ou les plus recherchées sont celles qui permettent d'allier développement optimal des plantes (biomasse), dépollution efficace des matrices (phytoextraction) et transfert non-négligeable des polluants vers les parties aériennes des plantes. Dans ce contexte, les capacités de phytoextraction des macrophytes, *P. australis*, ont été évaluées en milieu hydroponique, en conditions contrôlées, sur une exposition de 7, 14, 21 et 28 jours et en utilisant des molécules radiomarquées (^{14}C -DCB, ^{14}C -TCB et ^{14}C - γHCH). A chaque temps d'exposition, la répartition des polluants dans les différents compartiments de la plante (feuilles, rhizome et racines) a été mesurée.

Publication 3 : A comparative study on the uptake and translocation of organochlorines by *Phragmites australis*

Angélique San Miguel, Patrick Ravanel, Muriel Raveton

En préparation pour Journal of Hazardous Materials

Participation : réalisation technique, analyses des résultats, réalisation des figures, écriture.

Chapitre III : Induction des enzymes de phytodégradation par les OCs

L'évaluation des capacités de phytodégradation est une étape importante de l'étude car elle permet d'estimer l'efficacité de dégradation des polluants organiques dans les tissus végétaux. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'induction des voies enzymatiques impliquées dans la détoxification des OCs et décrites dans la littérature (Edwards et al. 2000, Messner et al. 2003, Petroutsos et al. 2007a, Cummins et al. 2011). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux enzymes de phase II, les glutathion S-transférases et les glycosyltransférases. Cette étude a pu être réalisée en partenariat avec le Prof. Peter Schröder (Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen, Helmholtz Zentrum, München) et grâce à un financement européen du réseau scientifique européen COST 859 '*Phytotechnologies to Promote Sustainable Land Use and Improve Food Safety*'. Les *P. australis* ont été traités en mono-exposition (NOEC) et en multi-exposition (NOEC) aux OCs, en conditions contrôlées et en hydroponie, à des temps d'exposition allant de 7, 14, 21 et 28 jours. Les activités enzymatiques ont été mesurées dans chacun des compartiments de la plante (feuilles, rhizomes et racines).

Publication 4 : Response of Phase II detoxication enzymes in *Phragmites australis* exposed to organochlorines

Angélique San Miguel^a, Peter Schröder^b, Rudolf Harpaintedner^b, Patrick Ravanel^a, Muriel Raveton^{a*}

En préparation pour Environmental Science and Pollution Research

Participation : réalisation technique, analyses des résultats, réalisation des figures, écriture.

Chapitre IV : Adaptation des communautés bactériennes de la rhizosphère sous pression chimique des OCs

La rhizosphère est une zone d'échanges importante entre plante et microflore. La présence de polluants, ici de type OCs, peut modifier ces équilibres en perturbant la nature des exsudats racinaires, en éliminant certains organismes par toxicité directe, en modifiant la structure des communautés microbiennes.... Pour aborder cette problématique, nous avons étudié la flore bactérienne issues de la rhizosphère de plantes (*Z. mays* et *P. australis*) exposées ou non à un mélange de OCs. Par des méthodes d'isolement et de séquençage, nous avons étudié l'adaptation de cette flore en fonction du traitement aux OCs et en mettant en évidence les espèces tolérantes à la pression chimique.

Publication 5 : Effects of organochlorines on microflora diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere

San Miguel A., Roy J., Gury J., Monier A., Coissac E., Ravanel P., Géremia R., Raveton M.

En préparation pour Environmental microbiology

Participation : réalisation technique, analyses des résultats, réalisation des figures, écriture.

7.3 Communications scientifiques durant la thèse

- **Octobre 2008 : Participation à un congrès scientifique, organisé par le réseau scientifique européen COST 859 "*Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety*" à Verneuil en Halatte (France)**

« *Phytotechnologies in practice – biomass production, agricultural methods, legacy, legal and economic aspects* »

Titre du poster : "Organochlorines : study of a potential remediation by plant" (Annexe1)

- **Avril à juillet 2009 : Mission de 3 mois "Short Term Scientific Mission-COST 859" à Munich (Helmholtz Zentrum München, Allemagne) au sein de l'équipe de recherche AMP - Abteilung Mikroben Pflanzen-Interaktionen, dirigée par le Professeur Peter Schröder.**

Titre de la mission : "Organochlorines impact on enzymatic activity in *Phragmites australis* tissues" (Annexe 2)

- **Octobre 2009 : Participation à un congrès européen (COST 859) à Ascona (Suisse)**

"Phyto 2009 - Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food aspects"

Titre de la présentation : "Purifying capacity of a water/soil/plant system, in relation to organochlorines: Analyses of eco-remediation potentials" (**Annexe 3**)

Titre du poster : "Ecoremediation - Organochlorines impacts on plant rhizosphere microflora communities" (**Annexe 4**)

- **Septembre 2010 : Participation à un congrès international, organisé par "The International Phytotechnology Society", à Parme (Italie)**

"7th International Conference on Phytotechnologies "Phytotechnologies in the 21st century: challenges after Copenhagen 2009. Remediation – Energy – Health – Sustainability"

Titre du poster : "Plant and organochlorines, uptake vs phytotoxicity" (**Annexe 5**)

Chapitre I

Evaluation de la phytotoxicité des OCs sur Zea mays et Phragmites australis

I. Problématique et démarche de l'étude

La stratégie d'étude des effets phytotoxiques sur les plantes de *Z. mays* et de *P. australis* a été abordée sous deux aspects :

- évaluation de la toxicité des OCs en fonction d'une gamme de concentration en mono-exposition,
- évaluation de la toxicité lors d'une multi-exposition aux OCs.

L'intérêt de considérer ces deux types d'exposition (mono et multi) permet (i) d'évaluer les concentrations ne provoquant pas d'effet toxiques (NOEC), (ii) de comparer la toxicité des molécules OCs entre elles, (iii) d'évaluer les processus de défense spécifiques des cellules végétales en réponse au type chimique de l'exposition et (iv) de comparer les réponses cellulaires obtenues en mono-exposition à celles obtenues en présence d'une multi-exposition. Le mélange d'OCs testé est d'une importance primordiale car les plantes en conditions environnementales naturelles sont généralement exposées à des mélanges de polluants.

Pour comparer ces deux niveaux d'exposition, nous avons choisi de suivre des symptômes macroscopiques d'effets toxiques (biomasse, taille des organes, pigmentation, malformation) et de suivre des paramètres physiologiques et biochimiques correspondant aux réponses cellulaires en lien avec le stress chimique (Fig 33).

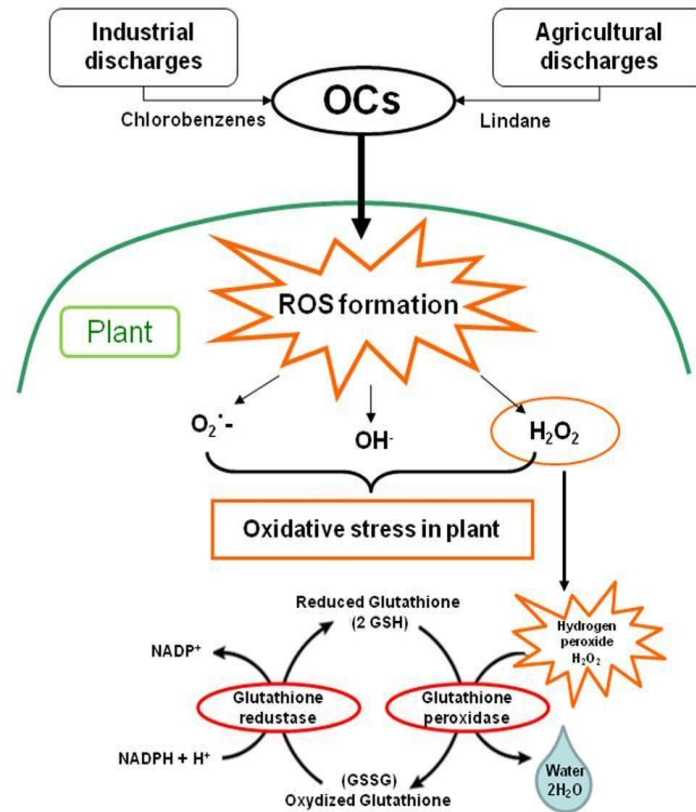


Figure 33 : Représentation du stress oxydatif chez les plantes et des paramètres mesurés dans notre étude : (1) Production de H_2O_2 , (2) Activité peroxydases (POD), (3) Activité glutathion réductase.

II. Approche expérimentale

Le maïs (*Z. mays*) est une plante modèle dont la culture est facile et dont les cycles physiologiques de développement sont contrôlés. Par conséquent, cette plante nous a servi à mettre au point les méthodes expérimentales.

Les plantes ont été exposées aux OCs en milieu hydroponique et en conditions contrôlées (16:8h jour : nuit ; $70 \pm 5\%$ humidité relative ; $25 \pm 2^\circ C$; $250 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ radiation photosynthétiquement active). Après 7 à 21 jours d'exposition, les plantes sont collectées et disséquées afin d'évaluer (**Fig 34**):

- les effets létaux (mort des plantes, mortalité cellulaire),
- les effets phytotoxiques macroscopiques (gain de biomasse, croissances, dépigmentation chlorophyllienne, nécroses,...),
- les effets sur le stress oxydant (H_2O_2),
- les effets biochimiques de défense (POD, GR).

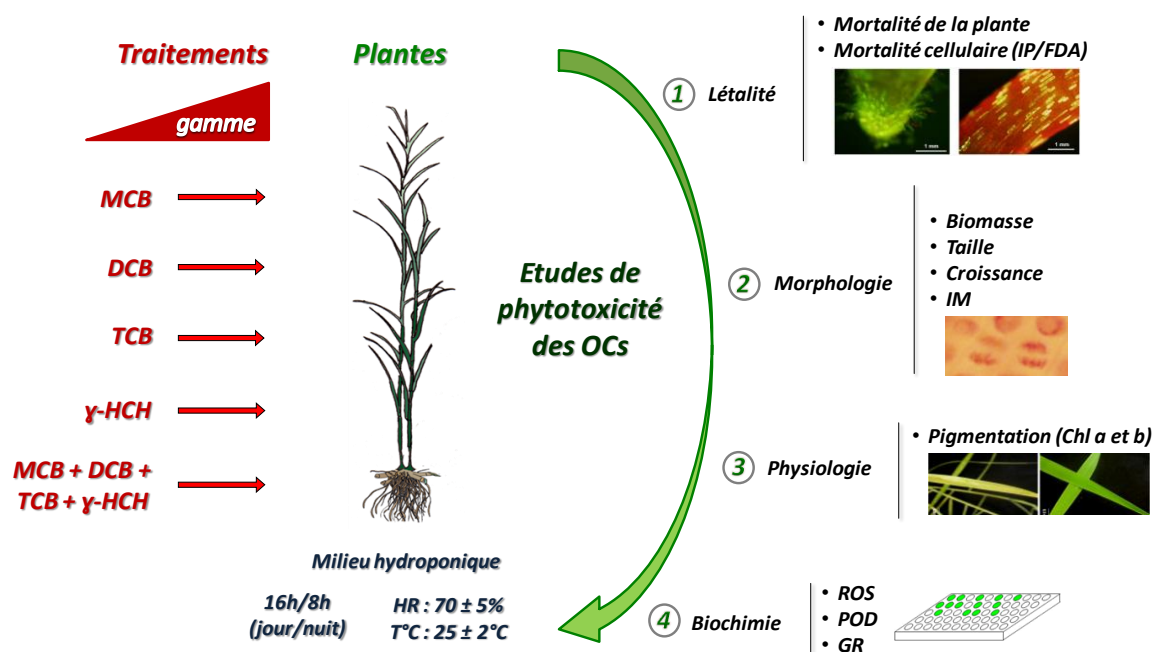


Figure 34 : Schéma expérimental mis en place pour la mise en évidence de la phytotoxicité des OCs sur *Z.*

mays et *P. australis*. Protocoles ①②③ : **Publication 1**. Protocoles ①③④ : **Publication 2**. HR : Humidité Relative ; IP : Iodure de Propidium ; FDA : Fluoroscéine Di-Acétate ; IM : indice mitotique ; ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène ; POD : Peroxydases ; GR : Glutathion Réductase.

III. Résultats et discussion

1. Phytotoxicité en mono-exposition

1.1. Evaluation des effets morphologiques en fonction des concentrations d'exposition aux OCs

Les plantes de *Z. mays* et de *P. australis* exposées aux OCs montrent des signes de sensibilité à chacune des molécules testées et à des concentrations relativement élevées ($> 10 \text{ mg l}^{-1}$). Les effets macroscopiques principalement observés correspondaient à une diminution du développement global de la plante (faible gain de biomasse et diminution de taille des organes ; **Fig 35**) couplée à des malformations, *e.g.* épaississements des apex racinaires (**Fig 36**) liés à une augmentation de la taille des cellules corticales et des inhibitions de la division mitotique (**Fig 37 ; Publication 2**)

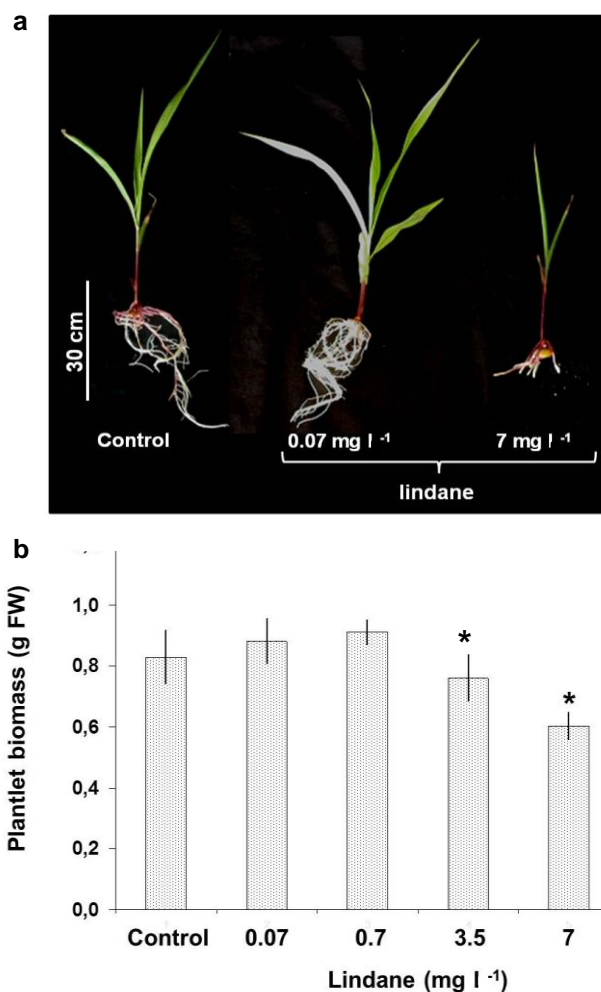


Figure 35 : Morphologie des plantes de maïs âgées de 15 jours exposées à une gamme de lindane (0, 0,07 et 7 mg l⁻¹). **a.** Observation qualitative ; **b.** Suivi du gain de biomasse en fonction de la gamme d'exposition au lindane.

**, P<0.01; Test ANOVA, n = 10. Les résultats représentent la moyenne ± erreur standard.

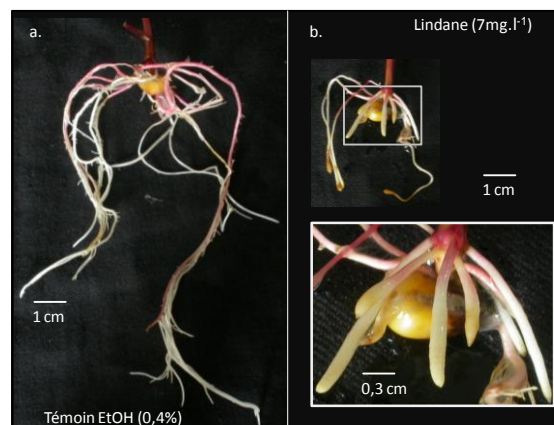


Figure 36 : Morphologie des racines de maïs exposées au lindane (7mg l⁻¹, 7 jours) : **a.** racines d'une plantule témoin ; **b.** racines d'une plantule traitée

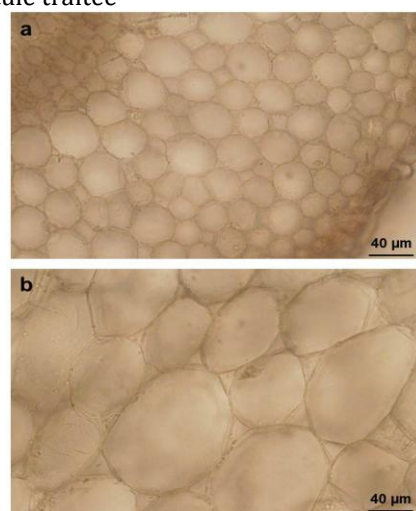


Figure 37 : Morphologie des cellules racinaires de plants de maïs (**a**) témoins et (**b**) exposés au lindane (7mg l⁻¹, 7 jours).

Microscope photonique (Nikon Universal CONDENSER C-CU 079022), grossissement 400.

De tels symptômes sont plus difficilement observables sur les plants de *P. australis* car la physiologie de cette espèce végétale est différente avec un développement racinaire plus lent. Cependant, dans la même gamme d'exposition (>10 mg l⁻¹), des effets morphologiques importants concernant la biomasse globale des plantes, la pigmentation et l'apparition de zones nécrotiques ont été observés sur les plantes (**Publication 2**). Cette approche d'observations macroscopiques a permis de sélectionner les concentrations en OCs ne provoquant pas d'effets toxiques majeurs. Ces niveaux d'exposition sub-létaux, nous ont permis d'étudier la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les réponses biochimiques de gestion du stress oxydant généré.

1.2. Mesure du stress oxydant

Le stress oxydant est un mécanisme activé par des stimuli environnementaux mais aussi par de nombreux polluants comme les métaux (Landberg and Greger 2002, Paradiso et al. 2008) les pesticides (Geoffroy et al. 2004, Sunohara and Matsumoto 2008) les HAPs (Liu et al. 2009) et les organochlorés (Monferran et al. 2007, Michalowicz and Duda 2009). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) synthétisées correspondent au radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), au radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et à l'anion hydroxyle (HO^-) (Mittler et al. 2004). H_2O_2 est une molécule signalé clé chez les plantes de par sa durée de vie plus importante que les autres ROS (Mittler et al. 2004, Foyer and Noctor 2005, Zimmermann and Zentgraf 2005).

Les OCs testés (MCB, DCB, TCB, HCH) sont capables de provoquer la synthèse de ROS dont le niveau de production est corrélé à l'exposition (exemple avec le lindane **Figure 38**). Par ailleurs, le taux de production des ROS au niveau des racines, est corrélé au degré de chloration des molécules puisque le taux de H_2O_2 augmente dans l'ordre d'exposition suivant, $MCB < DCB < TCB < \gamma\text{-HCH}$ (**Publication 1**, exemple avec le lindane **Figure 39**).

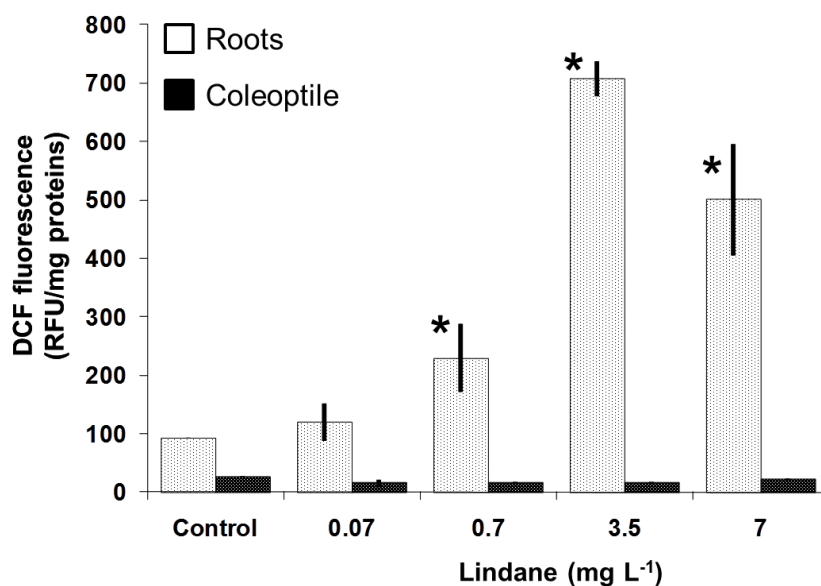


Figure 38 : Production de ROS (H₂O₂) dans les racines et feuilles de plants de maïs exposés au lindane.

H₂O₂ est mesuré par dosage de fluorescence (2',7'-dichlorofluoresceïne) normalisé par la quantité de protéine. Les résultats sont la moyenne \pm ES (n = 5). *, P < 0,05, Mann-Whitney.

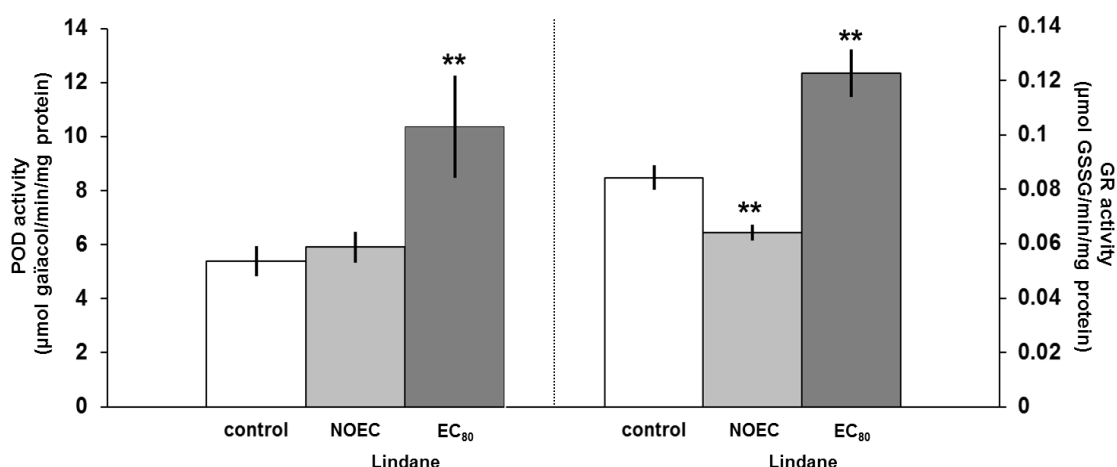


Figure 39 : Effets du lindane sur les activités POD et GR dans les racines de *Z. mays* pendant 7 jours d'exposition.

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ES (n = 5). **, P < 0,01 (Mann-Whitney).

L'analyse des activités enzymatiques impliquées dans le processus de gestion du stress oxydant (peroxydases POD, EC 1.11.1.7, glutathion réductase GR, EC 1.6.4.2) permet de mettre en évidence la réponse des plantes face au stress chimique (**Fig 38**). Les OCs induisent les activités POD et GR dans les organes des plantes exposées (**Fig 39** ; **Publications 1 et 2**). L'induction est corrélée à la dose d'exposition des plantes c'est-à-dire une augmentation des activités lorsque la dose d'exposition augmente. Dans

certain cas, le niveau d'activité des enzymes n'atteint pas un niveau de catalyse suffisant pour assurer une protection maximale de l'intégrité cellulaire. Effectivement, la peroxydation des lipides est mesurée chez les plantes exposées à des concentrations élevées en OCs ($> 10 \text{ mg l}^{-1}$; **Publication 1**). Cependant, la gestion des ROS par ce système enzymatique est efficace pour l'ensemble des chlorobenzènes (MCB, DCB, TCB) puisque aucune mortalité cellulaire n'est à signaler quelle que soit l'exposition (**Publication 1**). Seul le lindane (γHCH) à la concentration maximale provoque une mortalité importante des cellules racinaires (**Fig 40**).

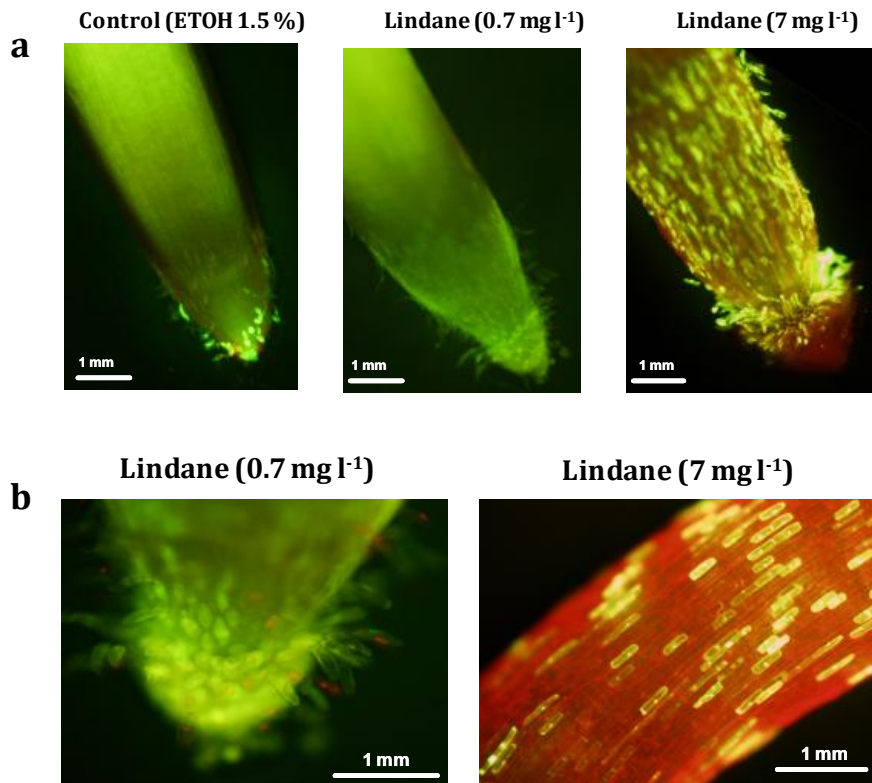


Figure 40 : Mise en évidence de la mortalité cellulaires au niveau des racines de *Zea mays* exposées au lindane ; **(a)** observation des racines (grossissement 20) et **(b)** observation en détail des zones méristématiques (grossissement 60). Le marquage à la fluorescéine (vert = des cellules vivantes) et iodure de propidium (rouge = cellules mortes) est observé en microscopie à épifluorescence (excitation à 450-490 nm, émission ≥ 520 nm, Olympus SZX12).

1.3. Tolérance des plantes aux OCs

Les OCs induisent une phytotoxicité évidente (effets létaux et macroscopiques) sur les deux espèces végétales testées (*Z. mays* et *P. australis*). Toutefois, ces effets sont observables pour des concentrations d'exposition élevées (>10 mg l⁻¹). L'un des symptômes majeur est l'inhibition de la croissance des plantes qui pourrait être due à l'inhibition de la division cellulaire (**Publication 1** (Charnets Wa et al. 1973 Scholès 1953)). Une autre hypothèse expliquerait cette inhibition où les OCs perturberaient le métabolisme des carbohydrates conduisant au blocage du transport du saccharose avec une accumulation importante d'amidon au niveau des feuilles (Rauser 1978,

Samarakoon and Rauser 1979, Moya et al. 1993). La baisse en fourniture de saccharose aux méristèmes racinaires entraînerait de ce fait, une diminution de l'activité mitotique avec arrêt du processus d'élongation (L'Huillier 1997, Du et al. 2006).

En dessous de ce seuil d'exposition (10 mg l^{-1}), des dosages au niveau tissulaire des plantes montrent que les OCs provoquent une augmentation de synthèse des ROS. Des études précédentes semblent démontrer que les molécules chlorées libèrent lors de leur métabolisation des atomes $\text{Cl}^{\cdot-}$ (Park et al. 2000, Hatzios and Burgos 2004, Talano et al. 2010). Ces atomes chargés de chlore seraient à l'origine directe de la synthèse de ROS. Par ailleurs, le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) seraient capables de déchlorer les OCs générant des radicaux secondaires ayant des potentiels de réactivité oxydante variables (Sinha 2002, Pennathur et al. 2010). L'ensemble de ces ROS et des radicaux libres générés à partir des molécules chlorées pourrait causer des dommages cellulaires dont la relation ROS-stress oxydant dépendrait de leur taux de production. Ainsi, le degré de chloration des molécules induirait un stress oxydant plus fort de par la synthèse plus importante de ROS, liée à la libération plus importante d'ions $\text{Cl}^{\cdot-}$ ($\text{MCB} < \text{DCB} < \text{TCB} < \gamma\text{HCH}$; **Publication 1**). Le système de gestion des ROS semble capable de gérer ces molécules pour des concentrations en OCs $< 10 \text{ mg l}^{-1}$ (**Publications 1 et 2**). Pour chaque OC, les concentrations seuils sans effet toxique sur les plantes ont été évaluées en se basant sur le taux de chlorophylle et l'intensité des activités enzymatiques impliquées dans la gestion du stress oxydant (**Publications 1 et 2**). Les $\text{NOEC}_{7\text{jours}}$ déterminées pour chaque OC sont similaires pour *Z. mays* et *P. australis* dans nos conditions (**Tableau 12**). Ces concentrations, sont entre 100 et 1000 fois plus élevées individuellement, que les concentrations environnementales mesurées ainsi que sur les sites industriels.

Tableau 12 : Détermination des NOEC_{7jours} pour chaque OC testé sur *Z. mays* et *P. australis*.

Traitements	γ -HCH	1,2,4-TCB	1,4-DCB	MCB
Limite de solubilité (mg l ⁻¹)	7	40	80	80
NOEC (mg l ⁻¹)	0,7	10	0,8	0,8

2. Multi-exposition

2.1. Effet synergique/cumulatif du mélange des OCs

Cependant une exposition des plantes à un mélange de ces quatre composés aux concentrations NOEC_{7jours} provoque un effet phytotoxique (*e.g.*, 23 % de perte de biomasse chez le maïs, flétrissement des feuilles chez *P. australis* **Fig 41 A**). Il semblerait que les quatre OCs puissent agir sur les fonctions vitales des plantes par des actions synergiques ou cumulatives. Ce phénomène est observable en mesurant la quantité de chlorophylles dans les feuilles des plantes traitées au mélange des OCs aux doses NOEC_{7jours} (**Fig 41 B**, MIX1). Le mélange OCs induit une diminution significative (70%) de la quantité de chlorophylles. La NOEC_{7jours} du mélange des OCs a été évaluée à 0.175 mg l⁻¹ lindane + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 0.2 mg l⁻¹ MCB (**Publication 2**).

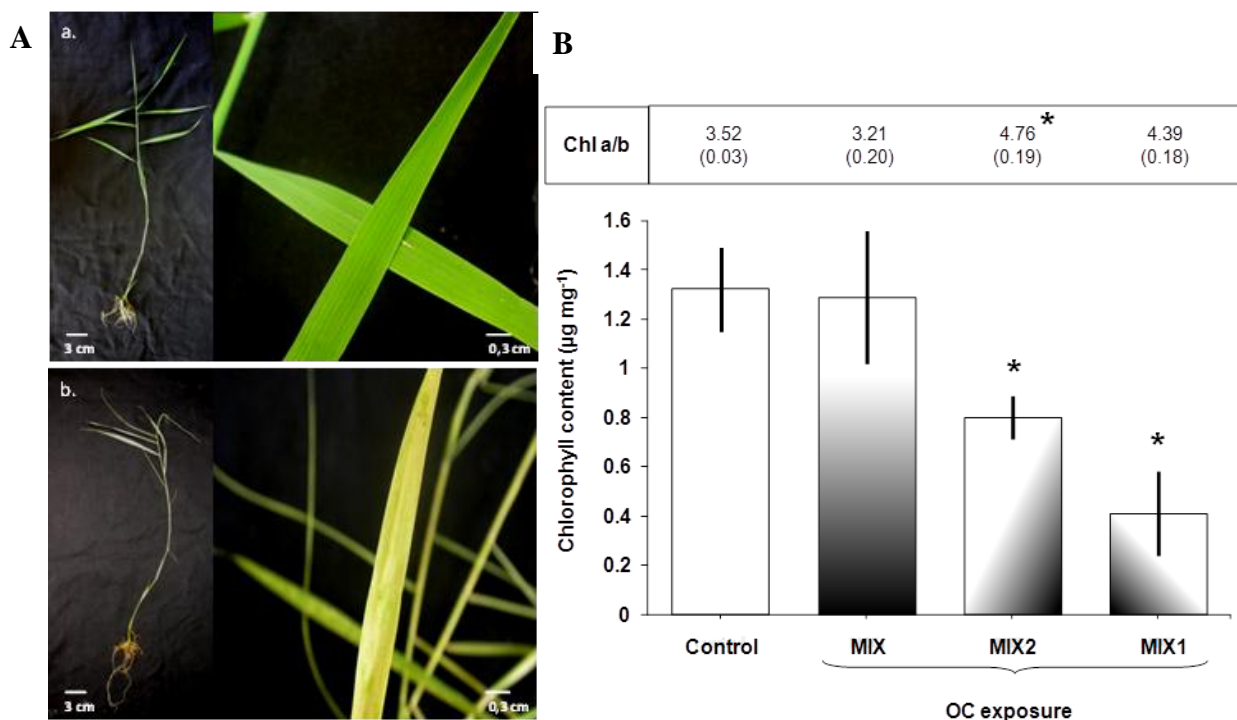


Figure 41 : Effets des OCs en mélange sur les parties aériennes des plantes de *P. australis* après 7 jours d'exposition.

A. Morphologie et pigmentation des feuilles de *P. australis* chez les contrôles (a) et les exposées aux OCs (b). L'exposition aux OCs correspond au mélange des concentrations NOEC (mg l^{-1}) (MCB=0,8 ; DCB=0,8 ; TCB=10 et HCH=0,7).

B. Taux de chlorophylles ainsi que le ratio chl a/b dans les feuilles de *P. australis* exposées ou non aux mélanges d'OCs. **MIX1** = 0,8 mg l^{-1} MCB + 0,8 mg l^{-1} DCB + 10 mg l^{-1} TCB + 0,7 mg l^{-1} HCH; **MIX2** = 0,4 mg l^{-1} MCB + 0,4 mg l^{-1} DCB + 5 mg l^{-1} TCB + 0,35 mg l^{-1} HCH; **MIX** = 0,2 mg l^{-1} MCB + 0,2 mg l^{-1} DCB + 2,5 mg l^{-1} TCB + 0,175 mg l^{-1} HCH

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ES ($n = 5$). *, $P < 0,05$ (Mann-Whitney).

2.2. Suivi du stress oxydant en fonction du temps d'exposition

Les *P. australis* exposées au NOEC_{7jours} du mélange des OCs ont été suivies pendant 21 jours afin d'évaluer les effets phytotoxiques sur un temps d'exposition plus long (**Publication 2**). L'analyse du taux de chlorophylles et de la quantité de protéines dans les plantes au cours du temps d'exposition ne témoigne pas d'effets nocifs potentiels sur la physiologie des plantes exposées en comparaison aux plantes témoins. L'analyse des activités enzymatiques impliquées dans le processus de gestion du stress oxydant (peroxydases POD, EC 1.11.1.7, glutathion réductase GR, EC 1.6.4.2) permet de mettre en évidence la rapidité de réponse des plantes face au stress chimique (**Fig 42**). Les résultats obtenus montrent que les activités POD sont induites dans les racines et les rhizomes dès 3 jours d'exposition. Dans les feuilles, les activités GR sont induites à 3

jours d'exposition alors qu'elles sont significativement plus basses que les témoins dans les autres organes (racines et rhizomes). Ces résultats montrent que les enzymes gérant le stress oxydant sont induites dès les premiers jours d'exposition et cette induction semble être suffisante puisque au-delà de 3 jours d'exposition, les activités enzymatiques testées sont similaires à celles des témoins. Ainsi, les plantes de *P. australis* possèdent un réseau de défense (en partie enzymatique) permettant de tolérer la pression chimique exercée par ce mélange d'OCs (0,2 mg l⁻¹ MCB + 0,2 mg l⁻¹ DCB + 2,5 mg l⁻¹ TCB + 0,175 mg l⁻¹ γHCH).

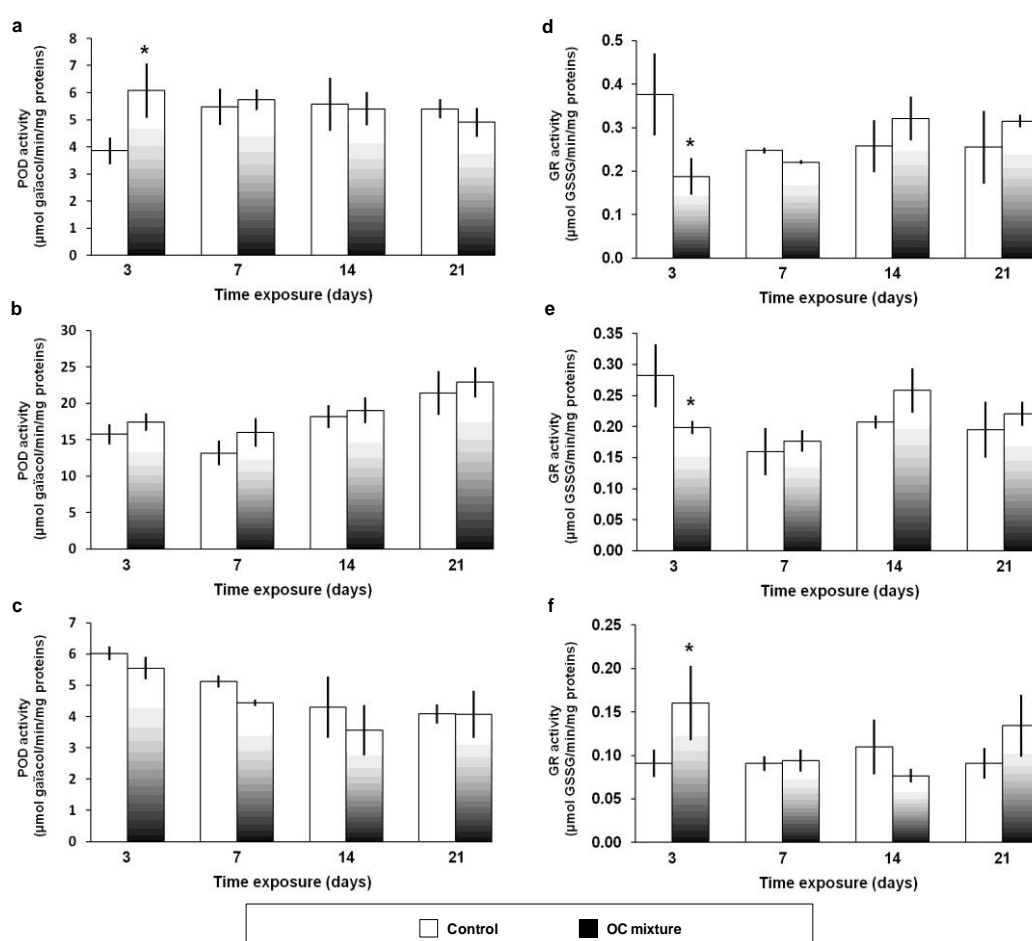


Figure 42 : Effets du mélange des OCs (MIX) sur les activités POD (a,b,c) et GR (d,e,f) dans les racines (a,d), les rhizomes (b,e) et les feuilles (c,f) de *Phragmites australis* sur 21 jours d'exposition.

Mélange OCs : 0,2 mg l⁻¹ MCB + 0,2 mg l⁻¹ DCB + 2,5 mg l⁻¹ TCB + 0,175 mg l⁻¹ γHCH.

Chaque valeur correspond à la moyenne ± ES (n = 5). *, P < 0,05 (Mann-Whitney).

IV. Conclusions

En conditions environnementales, les plantes sont exposées à un mélange d'OCs (Meharg et al. 2000, Ricking and Schwarzbauer 2008, Zhou et al. 2009) dont le 'cocktail' présente une complexité variable dans le temps et en fonction des matrices. Dans notre étude, le mélange d'OCs réalisé à la $\text{NOEC}_{7\text{jours}}$ pour chaque OC (0.8 mg l^{-1} MCB + 0.8 mg l^{-1} DCB + 10 mg l^{-1} TCB + 0.7 mg l^{-1} HCH) provoque une importante diminution de la quantité de chlorophylles (70%) après 7 jours d'exposition (**Publication 2**). D'après la littérature, il semblerait que cet effet toxique soit expliqué par une action synergique ou cumulative des OCs (Belden and Lydy 2000, 2006, Schuler et al. 2005). Les mécanismes physiologiques impliqués dans la synergie sont peu connus. Suivant Corbett (1974), la synergie pourrait résulter de l'interférence d'une molécule dans le métabolisme d'une autre molécule. D'autres études proposent l'idée que les molécules parentes du mélange et leurs métabolites agissent sur des cibles physiologiques différentes conduisant à un effet cumulatif de toxicité (El-Masri et al. 1996). Dans notre cas d'étude, nous avons démontré que les OCs présentaient un effet toxique lié à leur degré de chloration, dont la libération d'ions Cl^- pouvait engendrer un stress oxydant avec production de ROS et de radicaux libres (**Publication 1**). Nous pouvons supposer que le mélange d'OCs, dont les molécules présentent un degré de chloration différent, puissent libérer une quantité d'ions Cl^- plus importante dans les cellules végétales. Ce surplus de ROS et radicaux libres dépasserait les capacités enzymatiques de détoxification de ces molécules (POD, GR). De plus, les OCs semblent être métabolisés (peroxydases, P450) en chloro_n-phenols (Wang et al. 1996) métabolites présentant des effets toxiques directs sur les organismes (Ucisik and Trapp 2008, Biswas et al. 2010). Ainsi, la production de ROS, de radicaux libres et de métabolites de type phénoliques expliquerait l'effet toxique de type synergique/cumulatif observé chez les plantes exposé à un mélange d'OCs.

La $\text{NOEC}_{7\text{jours}}$ du mélange OCs a pu être évaluée en mesurant les paramètres de pigmentation et les paramètres biochimiques du stress oxydant. Ce mélange ($\text{NOEC}_{7\text{jours}}$: 0.2 mg l^{-1} MCB + 0.2 mg l^{-1} DCB + 2.5 mg l^{-1} TCB + 0.175 mg l^{-1} HCH) ne provoque pas de phytotoxicité sur *P. australis* pendant un temps d'exposition plus long (21 jours ; **Publication 2**). La vitalité des plantes s'expliquent par (i) une gestion efficace du stress oxydant généré par les OCs dès les premiers jours d'exposition et par (ii) une détoxification potentiellement efficace des OCs en métabolites moins toxiques (**Chapitre**

III). Ce mélange d'OCs est 100 à 500 fois plus faible que les doses environnementales mesurées, mêmes au niveau de zones spécifiquement contaminées par ce type de pollution, e.g. les sites industriels. Au final, il semble que les deux espèces de plantes que nous avons sélectionné (*Z. mays* et *P. australis*) soient tolérantes aux OCs, dans les doses détectées en conditions environnementales.

Publication 1

Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro and 1,2,4-trichloro-benzenes

Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes

Angélique San Miguel · Mathieu Faure ·
Patrick Ravanel · Muriel Raveton

Accepted: 12 September 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract A 7-day-exposure time experiment was designed to investigate the phytotoxicity of chlorobenzenes (CBs) on *Zea mays* seedlings, focusing on the growth and generation of oxidative stress. Significant growth inhibition (based on biomass gain) was observed for exposure to monochlorobenzene (MCB), dichlorobenzene (DCB) and trichlorobenzene (TCB) concentrations higher than 10 mg l^{-1} . It would seem that CBs inhibit cell division, since the mitotic index decreased for roots exposed to DCB at 80 mg l^{-1} dose (8%) and to all the TCB concentrations tested (20% inhibition). CBs exposure resulting in an increase in the oxidative stress response in maize seedlings [reactive oxygen species like H_2O_2 , antioxidant enzymes (POD, GR), lipid peroxidation] correlated to the compound's degree of chlorination, where damage increasing with the number of chlorine atoms ($\text{MCB} < \text{DCB} < \text{TCB}$). This biological response was also dependent on the dose-exposure. *Z. mays* exposed to CBs at concentrations $<10 \text{ mg l}^{-1}$ did not induce sufficient oxidative damage to cause root cell death. Therefore, CBs at current environmental concentrations are unlikely to produce evident phytotoxic effects on *Z. mays* seedlings.

Keywords Chlorobenzenes · *Zea mays* · Phytotoxicity · Oxidative stress · Defence response

Introduction

Chlorobenzenes (CBs) are widely used as solvents or as intermediates for manufacturing pesticides, chlorinated phenols and other chemicals (Chaudhry et al. 2002; Malcolm et al. 2004). Therefore, they are produced in large quantities for both domestic and industrial purposes (Wang et al. 1996). CBs are very commonly detected in ecosystems notably in the atmosphere (Popp et al. 2000; Lammel et al. 2009), in freshwater (Meharg et al. 2000), in sediments (Lee et al. 2000) and in urban sewage (Wang et al. 1996). They may contaminate ecosystems via the direct discharge of solid and liquid waste or through atmospheric volatilization. Mackay et al. (1996) have estimated that in Canada the total monochlorobenzene (MCB) released into the environment is $25,000 \text{ kg year}^{-1}$. A similar proportion of CBs release has been recorded in the USA (Malcolm et al. 2004). CBs concentrations in the environment are variable, e.g., $0.07\text{--}34.79 \text{ ng l}^{-1}$ for industrial drainage water catchments (Meharg et al. 2000) or $89.9\text{--}6,638 \text{ ng l}^{-1}$ for Chinese urban drainage (Zhou et al. 2009), $0.4\text{--}5.8 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ in sediments (Lee et al. 2000) and $3.98\text{--}71.3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ in UK sewage sludge (Wang and Jones 1994a). These compounds are relatively volatile and chemically stable with high octanol–water partition coefficients, consequently bioaccumulation could be expected in organisms (Malcolm et al. 2004). With the increasing concern regarding the health safety of food crops, some studies have reported that plants can bioaccumulate high levels of CBs from contaminated soils (Wang et al. 1996). CBs uptake by crop plants (soybean, carrots, spinach, cabbage, celery, tomato) has been reported in different studies (Wang and Jones 1994a, b; Kraaij and Connell 1997; Zhang et al. 2005; S. Miguel, unpublished data). Bioaccumulation seems to be correlated to soil or sludge contamination, to the physiological characteristics of

A. S. Miguel · M. Faure · P. Ravanel · M. Raveton (✉)
Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS no. 5553,
Université Joseph Fourier, BP 53,
38041 Grenoble Cedex 09, France
e-mail: muriel.raveton@ujf-grenoble.fr

vegetables, the lipid content of plant tissue and the CBs partition coefficient (Tam et al. 1996; Zhang et al. 2005).

Little information is available on the toxic effect of CBs on plants. Phytotoxicity measurements are generally based on growth inhibition. Several vegetables and macrophytes have been shown to be sensitive to medium to high CBs concentrations in sediments or water (Wang et al. 1996; Ma and Havelka 2009). Many of the stress mechanisms that are activated by different environmental stimuli are also activated by pollutants. The mechanisms involved in oxidative stress are important since heavy metals (Landberg and Greger 2002; Paradiso et al. 2008), pesticides (Geoffroy et al. 2004; Sunohara and Matsumoto 2008), PAHs (Liu et al. 2009) and organochlorines (Monferran et al. 2007; Michalowicz and Duda 2009) may cause reactive oxygen species (ROS) to form, including superoxide radical, hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (Mittler et al. 2004). H_2O_2 is a key signalling molecule in plants (relatively long half-life) (Mittler et al. 2004; Foyer and Noctor 2005; Zimmermann and Zentgraf 2005). ROS may lead to the oxidative destruction of cells (protein oxidation, lipid peroxidation, DNA damage etc.). A large panel of antioxidant molecules and enzymatic pathways are able to control intracellular ROS level (Mittler 2002; Mittler et al. 2004; Passardi et al. 2004; Foyer and Noctor 2005; Rouhier et al. 2008). Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) belong to a large family of enzymes that oxidize several substrates among which H_2O_2 (Cuypers et al. 2002; Passardi et al. 2004). Glutathione (GSH), a thiol tripeptide (γ -glutamate-cysteine-glycine), is an abundant metabolite in plants that has many diverse functions, including a prominent role as antioxidant and as an actor in the enzymatic machinery that controls cellular H_2O_2 levels (Lomonte et al. 2010). In most reactions involving GSH, the thiol group is oxidized to generate GSSG (oxidized GSH). The GSSG formed in this reaction is subsequently reduced by NADPH-dependent glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) (Mittler et al. 2004; Rouhier et al. 2008). Therefore, GR is a key enzyme for protecting cells against ROS damage, in particular by maintaining a high GSH/GSSG ratio (Apel and Hirt 2004; Foyer and Noctor 2005; Lomonte et al. 2010).

The main aim of the present work was to assess defence system responses in *Zea mays*, experimentally exposed to MCB, 1,4-dichlorobenzene (DCB) and 1,2,4-trichlorobenzene (TCB). *Z. mays* was selected for this study because of its semivolatile organic compounds uptake capacities, notably CBs (Dobrowolska et al. 1991; Schroll and Scheunert 1992; Bohme et al. 1999). Aiming to contribute to a better understanding of the toxicology of these organochlorine compounds, we focused on determining effects of CBs on growth, ROS production, antioxidant enzymes (POD, GR), lipid peroxidation, and cell viability in both

roots and shoots, and on evaluating maize tolerance to exposure to CBs.

Materials and methods

Chemicals

The chemicals used in this study were MCB, DCB and TCB (Fig. 1) and were purchased at Sigma-Aldrich (Germany) as pure standards (99% of purity). MCB was provided directly solubilized in methanol.

Plant material, growth conditions and treatments

Maize seeds (*Z. mays* L., cv. Furio, Syngenta Seeds) were surface sterilised in 80% (v/v) ethanol for 30 s and then in 5% (w/v) sodium hypochlorite for 2 min before washing several times in sterilised distilled water (Figueiredo et al. 2007). Seeds were then germinated in individual sterile pots (1 seed/pot) containing Hoagland nutritive solution, with or without CBs treatments [MCB (120, 80, 40, 12 and 0.8 mg l^{-1}), DCB (80-water limit solubility, 40, 8, 0.8 and 0.08 mg l^{-1}) and TCB (40-water limit solubility, 30, 20, 10 and 1 mg l^{-1})]. Control plants were supplied with Hoagland solution containing 1% of solvent used to dissolve CBs (ethanol or methanol). All plants were cultivated under controlled conditions (16:8 h light:dark; $70 \pm 5\%$ relative humidity; $25 \pm 2^\circ\text{C}$; $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ photosynthetically active radiation). In these conditions, no microorganisms developed in the rhizosphere. Seedlings were harvested for the different analyses after 7 days of exposure to CBs. The gain in biomass was determined by fresh weight (from seedling just after germination to 7-day plantlets, $n = 10$).

Mitotic index

Root tips (meristem zones, 1–2 mm, 3 tips) were cut from maize plants after 7 days exposure to CBs and placed overnight in Carnoy solution (1 ml, darkness, 4°C) containing ethanol/glacial acetic acid (3/1; v/v). Fixed tissues were rinsed with distilled water and hydrolysed with 1 M HCl as described by Paradiso et al. (2008): 15 min at room temperature, 10 min at 60°C and 20 min at room temperature, rinsed with distilled water and stained with orcein. For each test condition, the root tips were crushed onto glass in the presence of 45% acetic acid, and the cells were observed under microscope (Nikon E600). 8,000–10,000 cells were counted ($n = 5$; 3 root tips per count; 1,500–2,000 cells per count) per CBs concentration. The mitotic index (MI) was expressed as the percentage of dividing cells.

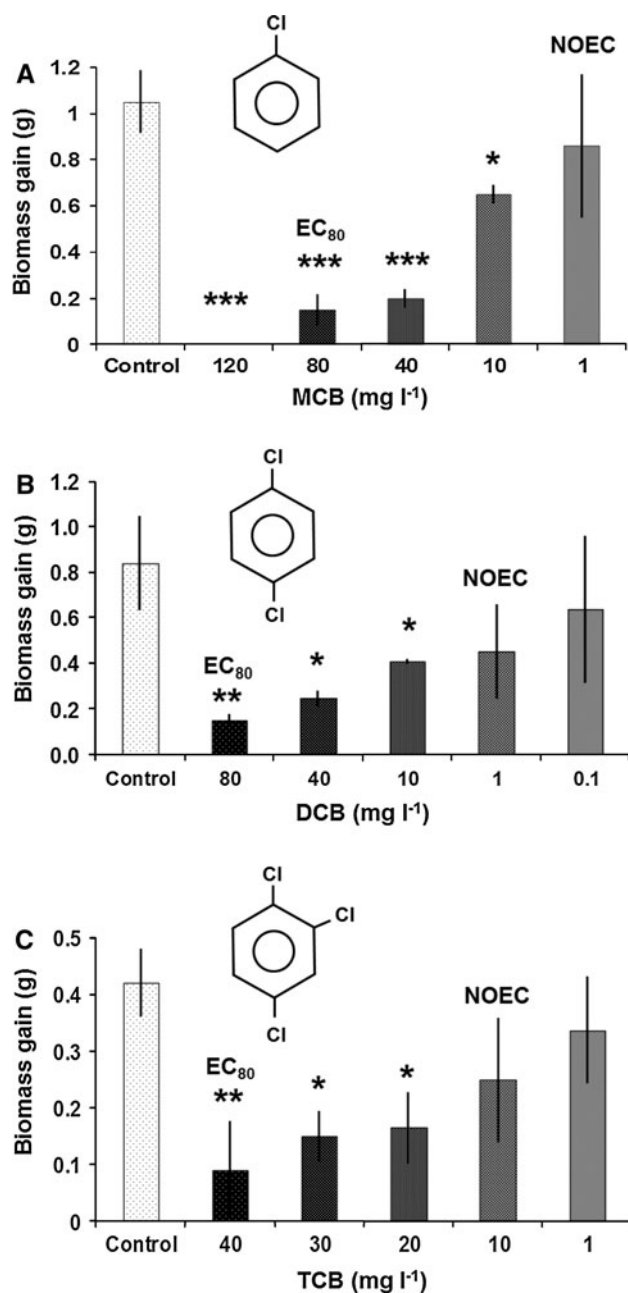


Fig. 1 Effects of MCB (a), DCB (b) and TCB (c) on the growth of 7-day old maize plantlet. Maize seedlings were cultured in hydroponic solutions containing CBs (MCB monochlorobenzene; DCB dichlorobenzene; TCB trichlorobenzene) at different concentrations. NOEC no observed effect concentration; EC₈₀ concentration causing 80% of growth inhibition. An asterisk indicates that mean values are significantly different for the treatment compared to the control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Vertical bars represent standard error of the mean ($n = 10$)

Measurement of ROS level

Intracellular ROS level was measured in treated and untreated 7-day old plants. The protocol was adapted from He and Hader (2002). After different treatments, seedling

root tips (4–5 root segments from four plants per treatment) and coleoptile tips (four plants) were washed and incubated in H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; 5 μ M in distilled water) for 1 h in the dark at 25°C. After diffusing through the cell membrane, H₂DCF-DA is converted into cell-impermeant H₂DCF (dichlorodihydrofluorescein) by cellular esterases. In the presence of a proper oxidant (mainly H₂O₂), H₂DCF is converted into the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (Wrona and Wardman 2006). The organs (40 mg) were rapidly frozen in liquid nitrogen, ground into a fine powder and resuspended in 200 μ l ethanol. After centrifuging (1 min, 14,000g), the supernatant was collected and fluorescence was measured using a spectrofluorometer (Varioskan flash) with 485 nm excitation and 500–600 nm emission wavelengths. The fluorescence intensity at 530 nm normalised to the protein content was used to express ROS presence. Fluorescence of DCF derived from ROS oxidation was also observed under a fluorescence binocular (Olympus SZX12; excitation 450–490 nm, emission ≥ 520 nm) (Deng et al. 2010).

Enzyme assays

Fresh organs (roots, leaves + coleoptiles) were frozen in liquid nitrogen immediately after harvesting and stored at -20°C . The organs were ground in K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer (1/3, w/v; 50 mM, pH 7) including 10% (w/v) polyvinylpyrrolidone. The homogenate was centrifuged at 3,000g for 20 min at 4°C. The supernatant was used for enzyme activity and protein content assays (determined according to Bradford using BSA as standard). All spectrophotometric analyses were conducted using a Varioskan flash spectrophotometer (Landberg and Greger 2002).

Guaiacol peroxidase activity (POD; EC 1.11.1.7) was measured according to Landberg and Greger (2002). The activity was assayed for 10 min (measurement every 30 s) in a reaction solution (200 μ l final volume; 96-well microplates) composed of 10 mM H₂O₂ and 9 mM guaiacol in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 2.5 μ g or 10 μ g proteins, respectively for root and leaf enzyme extracts. Absorbance was measured at 470 nm ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

GR (EC 1.6.4.2) activity was determined by measuring the decrease in the absorbance of NADPH at 340 nm. The reaction mixture contained 25 mM K-phosphate buffer (pH 7.8), 5 mM GSSG, 1.2 mM NADPH·Na₄ and 50 μ g protein (200 μ l final volume; 96-well microplates). The reaction was measured every 30 s over 10 min and GR activity was calculated from the reduced GSSG concentration using the extinction coefficient $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Murshed et al. 2008).

Lipid peroxidation

The organs (0.5 g) were ground in 5 ml of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). After centrifuging (14,000 g, 10 min, 4°C), 1 ml of supernatant was added to 4 ml of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) in 20% TCA. The mixture was heated at 96°C, 30 min and then cooled in ice. The amount of TBA–malondialdehyde (MDA) complex was calculated by subtracting the absorption value at 600 nm from that at 532 nm. MDA concentration was calculated using an extinction coefficient of $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Michalowicz and Duda 2009).

Detection of cell viability

Root segments (1 cm from apical tip) were immersed in a mixture of $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ fluorescein diacetate (FDA; Sigma) and $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ PI (propidium iodide; Sigma) for 10 min in darkness, and then washed with distilled water. The root tips were observed in distilled water under a fluorescence microscope (Nikon E600). The excitation wavelengths were 450–490 nm and emission ≥ 520 nm. Green (fluorescein) and red (PI) fluorescence indicated viable and dead cells, respectively (Sunohara and Matsumoto 2008).

Root cell viability was also assessed using Evans blue staining, where root tip segments were collected and immersed in 0.25% (w/v) aqueous solution of Evans blue for 1 h at room temperature (Sunohara and Matsumoto 2008). The stained roots were washed with distilled water (15 min) and then, put into *N,N*-dimethylformamide (200 μl) overnight at 30°C (darkness). Absorbance of the Evans blue released in the *N,N*-dimethylformamide was measured at 600 nm (Varioskan flash) and normalised to the fresh weight.

Statistics

The Gaussian distribution of the data was analysed using a Shapiro–Wilk test (XLSTAT 2007.5). Mann–Whitney tests (non-parametric) were fitted for each parameter measured (biomass, MI, ROS content, enzymatic activities, lipid peroxidation, cell viability) to estimate the effects of CBs exposure on plants. Control plants (exposed to 1% of ethanol or methanol) did not present significant differences in biomass, MI, ROS production, POD/GR activities, lipid peroxidation and cell viability. Therefore for each parameter measured, we report ‘plant control’ results as the mean \pm standard error of both ethanol and methanol exposures.

Results

Effects of chlorobenzenes on plant growth

When maize seeds were germinated in the presence of CBs, no decrease in the germination rate was measured (Mann–Whitney; 0.3–0.9 *P* range). Maize seedlings grown in the presence of CBs did not show necrotic or chlorotic symptoms in the leaves during the 7 day exposure period, while roots exposed at the highest concentrations of CBs were fewer, shorter and brownish compared to controls. On the other hand, CBs affected plant growth since seedling length and biomass were reduced in a dose-dependent manner (Fig. 1). Significant growth inhibition (40–90% reduction of biomass) was observed for CBs concentrations higher than 10 mg l^{-1} . In this range of CBs concentrations, the roots showed specific symptoms of stress in the thickness of the root tips and the lateral roots were of a higher diameter and poorly ramified. MCB and DCB significantly hindered biomass growth ($80 \pm 5\%$) both at 80 mg l^{-1} (EC₈₀). The same level of phytotoxicity was obtained with 40 mg l^{-1} TCB. The threshold concentration for growth disturbance was measured at 10 mg l^{-1} . Therefore, treatments with 1 mg l^{-1} MCB, 1 mg l^{-1} DCB and 10 mg l^{-1} TCB did not induce significant growth disturbances and those concentrations were chosen as the no observed effect concentration (NOEC).

Table 1 shows the effects of CBs on the MI of maize root meristem cells exposed over a 7 day period. MCB treatments did not inhibit MI in roots but the plant growth inhibition observed at the 80 mg l^{-1} exposure could be mainly explained by a significant decrease in leaf growth ($P = 0.0007$). DCB and TCB did slightly affect root cell proliferation. The decline of MI was concentration dependent for DCB because inhibition of mitosis (8%; $P = 0.045$) was measured only at 80 mg l^{-1} . TCB treatments, whatever the concentrations, induced the inhibition of meristematic cell proliferation (18.7% ($P = 0.01$) and

Table 1 MI (mean \pm SE) of *Z. mays* root tip cells exposed to CBs

	MI
Control	11.38 ± 0.80
MCB (1 mg l^{-1})	12.37 ± 0.43
MCB (80 mg l^{-1})	11.48 ± 1.75
DCB (1 mg l^{-1})	11.27 ± 2.53
DCB (80 mg l^{-1})	$10.42 \pm 0.66^*$
TCB (10 mg l^{-1})	$9.25 \pm 1.61^*$
TCB (40 mg l^{-1})	$9.01 \pm 2.03^*$

An asterisk indicates that mean values are significantly different for the treatment compared to the control (* $P < 0.05$; $n = 5$)

20.8% ($P = 0.016$), respectively at 10 and 40 mg l⁻¹ exposures). Both DCB and TCB caused leaf growth disturbances at respectively, 80 and 40 mg l⁻¹ exposure (respectively, $P = 0.04$ and $P = 0.003$).

ROS production

Hydrogen peroxide (H₂O₂) was measured using dichlorodihydrofluorescein which is converted into the highly fluorescent DCF. CBs led to an increase in H₂O₂ production in roots at 7 days' exposure (Fig. 2a). H₂O₂ accumulation in roots was significantly higher at CB-NOEC exposures but slightly decreased with CB dose-increase treatments. Nevertheless, CBs exposure at EC₈₀ concentrations always induced H₂O₂ accumulation that was significantly higher than the controls (10–160 fold). H₂O₂ accumulation in aerial parts was not significantly increased by CBs exposure whatever the concentration applied (Fig. 2b). MCB treatments did not modify H₂O₂ content compared to the control, while H₂O₂ content was

significantly reduced by DCB_(1 mg l⁻¹) and TCB_(10 mg l⁻¹) exposures (2.3-fold ($P = 0.02$) and 2.1-fold ($P = 0.02$) reduction, respectively). Only TCB_(40 mg l⁻¹) exposure seemed to increase H₂O₂ content (1.3-fold increase).

Effect of chlorobenzenes on antioxidant enzyme activities

POD activity differed in the organs of maize plantlets with a higher level of POD activity generally found in the roots (5–10-fold) rather than in the leaves (Fig. 3a, b). Moreover, the POD activity pattern was different according to the 7-day CBs exposures. MCB caused significant increases in POD activity in roots and leaves. DCB induced low levels of POD activity in roots. Interestingly, DCB_(80 mg l⁻¹) exposure caused a significant ($P = 0.0015$) drop in POD activity in roots and leaves. TCB did not modify POD activity with the exception of the 10 mg l⁻¹ treatment that

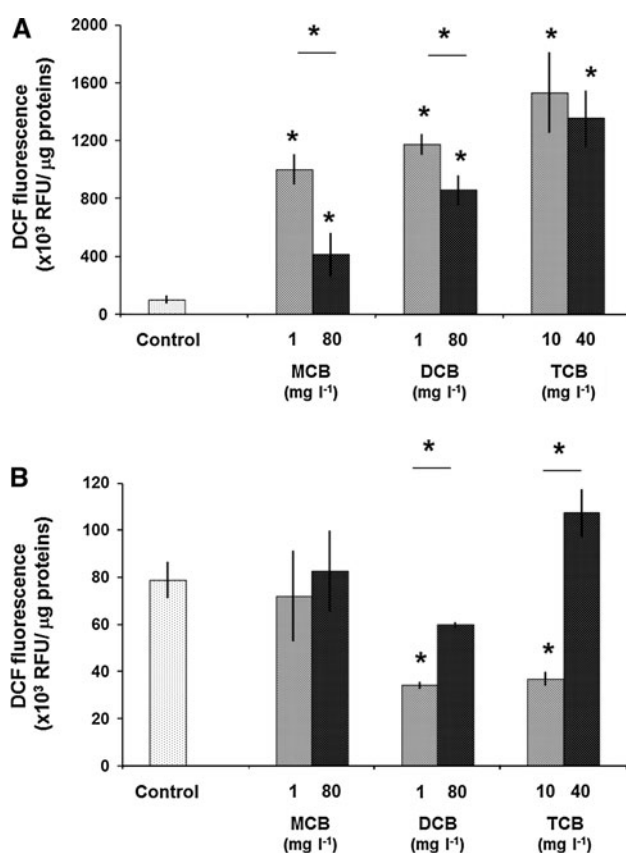


Fig. 2 Hydrogen peroxide accumulation in maize roots (a) and leaves (b). Seedlings were grown hydroponically for 7 days in the presence of CBs. DCF, 2',7'-dichlorofluorescein. An asterisk indicates that mean values are significantly different for CB exposure and the control ($*P < 0.05$). Vertical bars represent standard error of the mean ($n = 5$)

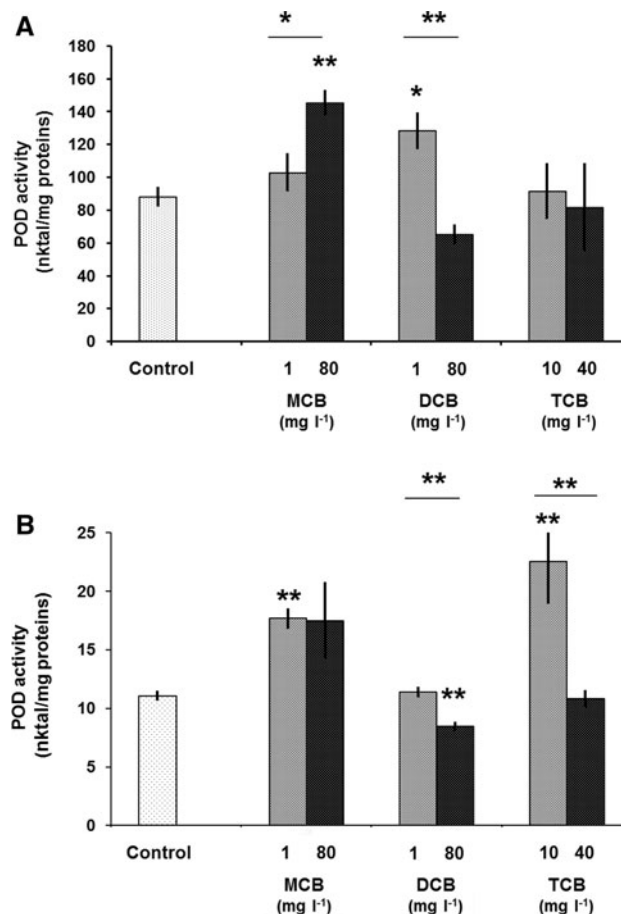


Fig. 3 Activities of PODs in roots (a) and in leaves (b) of *Z. mays* exposed to CBs. An asterisk indicates that mean values are significantly different between the treatment and the control ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$). Vertical bars represent standard error of the mean ($n = 5$)

greatly enhanced (2-fold, $P = 0.0018$) this activity in leaves.

GR activity was similar in roots and leaves of *Z. mays*. In roots, GR activity followed the same pattern of response whatever the CBs exposure (Fig. 4a). A slight decrease in GR activity was measured for the lowest MCB, DCB and TCB concentrations. On the other hand, GR activity at the maximal CBs concentrations was approximately 2-fold higher than that of the control. In leaves, GR activity was similar to the control, except for DCB treatments (Fig. 4b). GR activity was induced (1.4-fold, $P = 0.0457$) for DCB_(1 mg l⁻¹) exposure while higher DCB exposure decreased this enzyme activity (1.4-fold, $P = 0.0136$).

Membrane injury and cell viability

Lipid peroxidation in roots and leaves due to CBs treatments, measured as MDA content, is given in Fig. 5. The MDA content in roots increased with CBs concentration although not significantly (Fig. 5a). For example, TCB

exposure increased lipid peroxidation (1.7-fold) compared to the control. In leaves, MDA content was not modified by MCB exposure but was significantly increased by DCB and TCB exposure (2.5-fold) (Fig. 5b).

CBs exposure (7 days) did not cause obvious damage to cell viability (Fig. 6). Qualitative measurements using fluorescein did not show any difference between the controls and the CBs-exposed roots (Fig. 6a–d). Evans blue staining confirmed this first observation with no significant effect on cell death compared to the control (Fig. 6e).

Discussion

The toxicity of CBs on plants has been little studied (Kong et al. 1998; Calabrese and Baldwin 2002; Liu et al. 2003, 2004; Monferran et al. 2007). Although plants exposed to CBs show diverse stress responses, ranging from structural to biochemical changes, growth inhibition is a commonly observed event whatever the plant species, i.e. algae

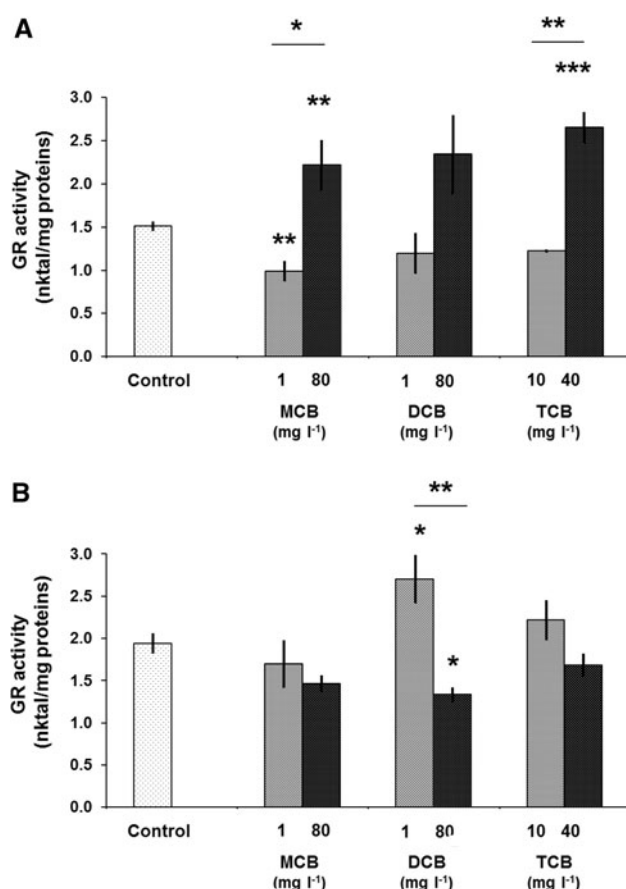


Fig. 4 Activities of GSH reductase in roots (a) and in leaves (b) of *Z. mays* exposed to CBs. An asterisk indicates that mean values are significantly different for the treatment compared to the control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Vertical bars represent standard error of the mean ($n = 5$)

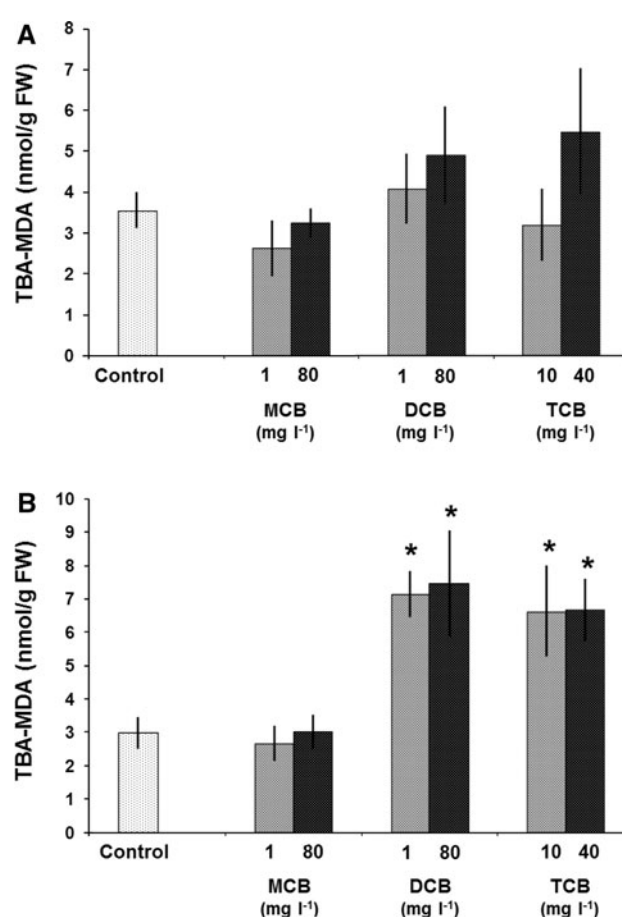


Fig. 5 Effects of CBs exposure on MDA in roots (a) and in leaves (b) of *Z. mays*. An asterisk indicates that mean values are significantly different for the treatment compared to the control (* $P < 0.05$). Vertical bars represent standard error of the mean ($n = 5$)

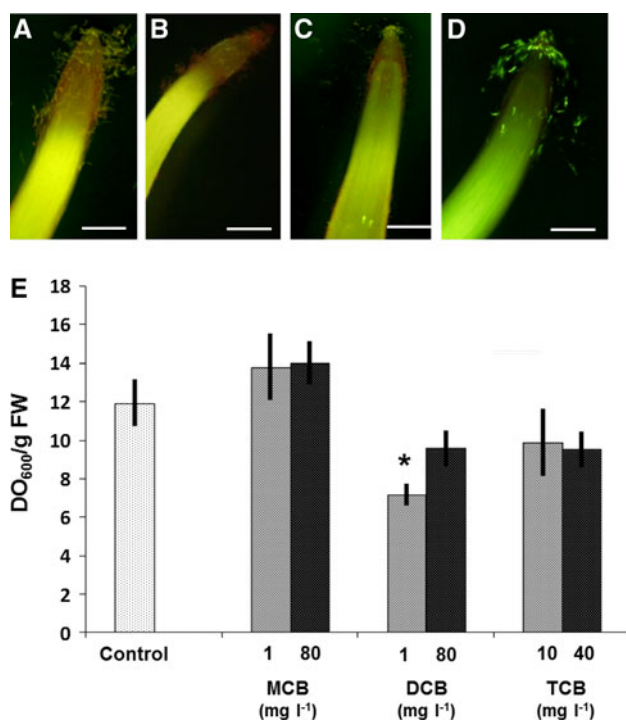


Fig. 6 Effects of CBs exposure on the cell viability of maize root tips. **a** Control, **b** 80 mg l⁻¹ MCB, **c** 80 mg l⁻¹ DCB and **d** 40 mg l⁻¹ TCB. Roots were stained with FDA-PI. Scale bar 1 mm. **e** Cell viability was measured using Evans blue uptake on maize roots. An asterisk indicates that mean values are significantly different for the treatment compared to the control (**P* < 0.05). Vertical bars represent standard error of the mean (*n* = 5)

(Calabrese and Baldwin 2002), macrophytes (Monferran et al. 2007), and crop plants (Liu et al. 2003, 2004). The results reported here also indicate that CBs negatively affected the growth of maize plants. Plant exposure to CBs at concentrations higher than 10 mg l⁻¹ caused significant growth inhibition with morphological disturbances (thickness of root tips, decrease in root ramification). TCB seemed to be less toxic (NOEC_{7days} = 10 mg l⁻¹) than DCB and MCB (NOEC_{7days} = 1 mg l⁻¹). *A contrario*, 80% of decrease in biomass gain was caused by only 40 mg l⁻¹ TCB against 80 mg l⁻¹ DCB and MCB exposures. Moreover, CBs did affect plant growth by inhibiting cell division since MI values decreased significantly in a dose-response for DCB (8% inhibition at 80 mg l⁻¹) and in TCB exposure (20% inhibition whatever the concentration). These results are supported by previous experiments where TCB exposure induces chromosomal aberration and micronuclei formation in the root tip cells of *Vicia faba* seedlings (Liu et al. 2003). Moreover, there is a significant dose-response relationship between TCB exposure and DNA strand breakage (comet assay) in the soybean nuclei of root tip cells (Liu et al. 2004). Measurements of these genotoxic effects are not significant in

soybean root cells exposed to MCB and hexachlorobenzene (HCB) (Liu et al. 2004). In the same way in this study, MCB did not induce a decline in the MI of maize root tips. Therefore, the compounds' degree of chlorination (the number of chlorine atoms on the benzene ring) seemed to be correlated to the inhibition of cell division, potentially inducing further growth disturbances. The same toxicity relationship between *Selenastrum capricornutum* growth and compounds' degree of chlorination (MCB < TCB < HCB) has also been observed by Kong et al. (1998).

ROS are highly reactive and are able to oxidize biological molecules, such as DNA, proteins or lipids (Dat et al. 2000). CBs are not suspected of directly generating ROS, since they do not catalyse Fenton-like reactions in biological systems (Pierre and Fontecave 1999). However, when maize plants were exposed to CBs, ROS overproduction occurred as shown in the analysis of hydrogen peroxide (H₂O₂). The moderate amount of H₂O₂ measured in control maize tissue is useful for cell elongation (Passardi et al. 2004) whereas H₂O₂ was generated in abundance in roots when exposed to all CBs, increasing with the compounds' degree of chlorination (Fig. 2a). The lowest CBs concentrations seemed to produce higher amounts of H₂O₂, a dose-response phenomenon characterised by low-dose stimulation and high-dose inhibition (Calabrese et al. 2010). In maize leaves, this overproduction of H₂O₂ was not so clear while an increase could be suspected in the case of TCB (Fig. 2b). Therefore, it was suggested that chlorinated-compounds generated the excessive production of H₂O₂ in plant tissue, in agreement with previous results obtained using chlorine xenobiotics, i.e. endosulfan, trichlorophenol, atrazine (Menone et al. 2008; Michalowicz and Duda 2009; Ramel et al. 2009).

The activity of enzymes such as POD (oxidation of H₂O₂) and GR (maintaining a high GSH/GSSG ratio) counterbalances the adverse effects of oxidative stress on cells by protecting membrane lipid peroxidation and therefore, maintaining cell membrane integrity (Passardi et al. 2004; Foyer and Noctor 2005). In the present study, CBs modified POD and GR activities differently in roots and leaves (Figs. 3, 4). In roots, CBs exposure caused a significant increase in POD and GR activities (Figs. 3a, 4a). Interestingly, POD activity was increased in inverse proportion to the chlorination degree for CBs exposure (TCB < DCB < MCB). As for GR activity, this was significantly induced in correlation to the chlorination degree for CBs exposure (MCB < DCB < TCB). Such results could highlight the time responses of root cells to CB exposure where, the most chlorinated compound (producing the highest amount of H₂O₂) induced ROS scavenging enzymes more rapidly and intensively than the least chlorinated compound. Therefore, POD might be induced to first detoxify H₂O₂ and then GR induced to maintain the

GSH/GSSG ratio. The level of POD inductions was different in function of CBs exposure. This could be explained by (i) the time scale response linked to the level of oxidative stress in the plant tissues and (ii) the hormesis phenomenon which has been reported in different plants exposed to chlorine aromatic hydrocarbons (Calabrese and Baldwin 2002; Menone and Pflugmacher 2005; Monferran et al. 2007). The dose–response of CBs exposure gave the same pattern for GR induction, increasing induction correlated to increasing CBs concentrations. In leaves, CBs oxidative effects were dependent on the translocation of CBs and/or metabolites from roots to leaves. Therefore, ROS production was deferred over time or negated according to the chemical nature of the metabolites. In this study, POD activity increased with CBs exposure (MCB < TCB) except for DCB for which a depletion was observed (Fig. 3b). Such drops have already been described for DCB on *Ceratophyllum demersum* at a similar level of concentration (1 mg l^{-1}) and explained by the hormesis phenomenon (Monferran et al. 2007). GR activity increased with DCB exposure while MCB and TCB did not induce a significant response (Fig. 4b).

CBs exposure caused a general activation of the maize's antioxidant system in response to oxidative stress, especially to scavenging ROS such as H_2O_2 (Figs. 3, 4). Such observations have been previously described for chlorinated compounds, i.e. DCB (Monferran et al. 2007), TCB, HCB (Liu et al. 2009), HCH (Sinha 2002) and endosulfan (Menone et al. 2008). Although, glutathione *S*-transferases (GST) activity could be induced by chlorinated compounds (DCB, Monferran et al. 2007; endosulfan, Menone et al. 2008; PCB, Menone and Pflugmacher 2005) to detoxify peroxides (Cummins et al. 1999) and/or to catalyse the conjugation of chlorinated compounds with GSH (Hatton et al. 1998; Cherifi et al. 2001; Marcacci et al. 2006; Bakkali et al. 2007; Petroustos et al. 2008). Therefore, the increase in GR activity could reflect the need to restore the oxidative balance between GSH and GSSG, a ratio which is altered due to GST detoxification and ROS scavenging.

ROS production did not seem to be efficiently scavenged by the POD and GR enzymes since lipid peroxidation was measured in roots (non-significantly, Fig. 6a) and leaves (Fig. 6b). Similar lipid peroxidation is obtained for TCB exposure in *V. faba* (Liu et al. 2003), and HCH exposure on *Hydrilla verticillata* (Sinha 2002). The level of lipid peroxidation increases with the chlorination degree of the CBs. Such cell alteration can be linked to enzyme inactivation (due to their detoxication capacity threshold) (Menone et al. 2008). The H_2O_2 surplus can be responsible for the early senescence of maize cells (Zimmermann and Zentgraf 2005). In 7-day exposure, CBs did not induce sufficient oxidative damage to include cell death (Fig. 6), even at the highest concentrations (80 mg l^{-1}).

CBs were chosen according to their degree of chlorination to assess their phytotoxic effects. Overall, cell division inhibition and oxidative stress induction in maize seedlings seemed to be correlated to the chlorination degree of the CBs. Therefore, chlorine atoms seemed to induce oxidative stress, and this may involve several processes. It has been suggested that during detoxication of the chlorinated compounds, PODs (Park et al. 2000; Talano et al. 2010) and monooxygenases P450 (Hatzios and Burgos 2004; Kawahigashi et al. 2005) could be involved in dehalogenation leading to the loss of Cl^- atoms. Furthermore, superoxide and hydrogen peroxide can displace chloride ions from chlorinated compounds generating secondary radicals of variable reactivity (Sinha 2002; Pennathur et al. 2010). These ROS and free radicals generated from chlorinated compounds may cause further cellular damage and might explain the relationship between oxidative stress induction and the chlorination degree of the CBs.

Analysis of subsoil from a former pesticide factory in Germany has shown that TCB are more dominant (60%) and total CBs concentrations range from 1.5 to $18,400 \text{ mg kg}^{-1}$ (Feidieker et al. 1994, 1995). The soil sorption coefficients for CBs range from 466 to 58,700 and generally increase with increasing chlorination degree (Malcolm et al. 2004). Therefore, CBs levels in soil water would be in the $\mu\text{g l}^{-1}$ to mg l^{-1} range. In contaminated soils, the present study showed that such CBs levels would not induce severe damage on maize, but further studies are required to assess the phytotoxic effects according to the duration of exposure. The highest CBs concentrations in surface water have been reported for river waters in heavily populated and/or industrialised areas. CBs concentrations in surface water are generally in the ng l^{-1} to $\mu\text{g l}^{-1}$ range, with maximum concentrations up to 0.2 mg l^{-1} in areas close to industrial sources (Malcolm et al. 2004). CBs levels in uncontaminated soils are generally less than 0.4 mg kg^{-1} (Wang and Jones 1994a). The present study demonstrated that maize exposed to such environmental CBs levels did not show significant oxidative damage. Therefore, CBs at environmental concentrations would be unlikely to cause phytotoxic effects on maize.

Conclusions

Based on the observations of the present study, it can be concluded that CBs exert oxidative stress on maize (*Z. mays*) seedlings, which is suggested by an increase in H_2O_2 and the induction of antioxidant enzymes (POD, GR) that serve as important components to scavenge ROS. CBs are effective on lipid peroxidation and plant growth in dose-dependent exposure for all the oxidative stress and

phytotoxic parameters measured in this study. Moreover, CBs effects seemed to be correlated to the benzene's chlorination degree, with damage increasing by an order of magnitude greater than that of the chlorination degree. Our results also suggest that CBs at current environmental concentrations did not appear to cause phytotoxic effects on *Z. mays*.

Acknowledgments This work is part of VALORSITE-PHYCO project funded by AXELERA. We are especially grateful to Agnès Pilas-Bégué for valuable suggestions. The authors wish to thank Version Originale for correcting the English text.

References

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399
- Bakkali Y, Ruiz-Santaella JP, Osuna MD, Wagner J, Fischer AJ, De Prado R (2007) Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-*p*-ethyl. *J Agric Food Chem* 55:4052–4058
- Bohme F, Welsch-Pausch K, McLachlan MS (1999) Uptake of airborne semivolatile organic compounds in agricultural plants: field measurements of interspecies variability. *Environ Sci Technol* 33:1805–1813
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2002) Hormesis and high-risk groups. *Regul Toxicol Pharmacol* 35:414–428
- Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Calabrese EJ, Mattson MP (2010) Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal* 13:1763–1811
- Chaudhry Q, Schroder P, Werck-Reichhart D, Grajek W, Marecik R (2002) Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 9:4–17
- Cherifi M, Raveton M, Picciocchi A, Ravel P, Tissut M (2001) Atrazine metabolism in corn seedlings. *Plant Physiol Biochem* 39:665–672
- Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J* 18:285–292
- Cuyper A, Vangronsveld J, Clijsters H (2002) Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *J Plant Physiol* 159:869–876
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57:779–795
- Deng XY, Li JW, Zhou ZQ, Fan HY (2010) Cell death in wheat roots induced by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Soil* 328:45–55
- Dobrowolska G, Muszynska G, Shugar D (1991) Benzimidazole nucleoside analogs as inhibitors of plant (maize seedling) casein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1080:221–226
- Feidieker D, Kampfer P, Dott W (1994) Microbiological and chemical evaluation of a site contaminated with chlorinated aromatic-compounds and hexachlorocyclohexanes. *FEMS Microbiol Ecol* 15:265–278
- Feidieker D, Kampfer P, Dott W (1995) Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic-compounds and HCH in the subsurface environment. *J Contam Hydrol* 19:145–169
- Figueiredo MVB, Burity HA, Martinez CR, Chanway CP (2007) Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. *World J Microbiol Biotechnol* 23:187–193
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28:1056–1071
- Geoffroy L, Frankart U, Eullaffroy P (2004) Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environ Pollut* 131:233–241
- Hatton PJ, Cummins I, Price LJ, Cole DJ, Edwards R (1998) Glutathione transferases and herbicide detoxification in suspension-cultured cells of giant foxtail (*Setaria faberi*). *Pestic Sci* 53:209–216
- Hatzios KK, Burgos N (2004) Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Sci* 52:454–467
- He YY, Hader DP (2002) UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine. *J Photochem Photobiol B* 66:115–124
- Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, Ohkawa Y (2005) Phytoremediation of metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP2B6. *J Agric Food Chem* 53:9155–9160
- Kong FX, Hu W, Liu Y (1998) Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ Exp Bot* 40:105–111
- Kraaij H, Connell DW (1997) Bioconcentration and uptake kinetics of chlorobenzenes in soy-bean roots. *Chemosphere* 34:2607–2620
- Lammel G, Klanova J, Kohoutek J, Prokes R, Ries L, Stohl A (2009) Observation and origin of organochlorine compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in the free troposphere over central Europe. *Environ Pollut* 157:3264–3271
- Landberg T, Greger M (2002) Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *J Plant Physiol* 159:69–75
- Lee CL, Song HJ, Fang MD (2000) Concentrations of chlorobenzenes, hexachlorobutadiene and heavy metals in surficial sediments of Kaohsiung coast, Taiwan. *Chemosphere* 41:889–899
- Liu W, Zhou QX, Li PJ, Sun TH, Yang YS, Xiong XZ (2003) 1,2,4-Trichlorobenzene induction of chromosomal aberrations and cell division of root-tip cells in *Vicia faba* seedlings. *Bull Environ Contam Toxicol* 71:689–697
- Liu W, Yang YS, Li P, Zhou Q, Sun T (2004) Root growth inhibition and induction of DNA damage in soybean (*Glycine max*) by chlorobenzenes in contaminated soil. *Chemosphere* 57:101–106
- Liu H, Weisman D, Ye YB, Cui B, Huang YH, Colon-Carmona A, Wang ZH (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 176:375–382
- Lomonte C, Sgherri C, Baker AJM, Kolev SD, Navari-Izzo F (2010) Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to mercury. *Environ Exp Bot* 69:9–16
- Ma XM, Havelka MM (2009) Phytotoxicity of chlorinated benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environ Toxicol* 24:43–48
- Mackay D, Di Guardo A, Paterson S, Kicsi G, Cowan CE, Kane M (1996) Assessment of chemical fate in the environment using evaluative, regional and local-scale models: illustrative application to chlorobenzene and linear alkylbenzene sulfonates. *Environ Toxicol Chem* 15:1638–1648
- Malcolm HM, Howe PD, Dobson S (2004) Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene: environmental aspects. World Health Organization, Geneva

- Marcacci S, Raveton M, Ravanel P, Schwitzguebel JP (2006) Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environ Exp Bot* 56:205–215
- Meharg AA, Wright J, Osborn D (2000) Chlorobenzenes in rivers draining industrial catchments. *Sci Total Environ* 251:243–253
- Menone ML, Pflugmacher S (2005) Effects of 3-chlorobiphenyl on photosynthetic oxygen production, glutathione content and detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Chemosphere* 60:79–84
- Menone ML, Pesce SF, Diaz MP, Moreno VJ, Wunderlin DA (2008) Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry* 69:1150–1157
- Michalowicz J, Duda W (2009) The effects of 2,4,5-trichlorophenol on some antioxidative parameters and the activity of glutathione S-transferase in reed canary grass leaves (*Phalaris arundinacea*). *Pol J Environ Stud* 18:845–852
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498
- Monferran MV, Wunderlin DA, Nimptsch J, Pflugmacher S (2007) Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68:2073–2079
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H (2008) Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Anal Biochem* 383:320–322
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, di Toppi LS, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L (2008) Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol* 49: 362–374
- Park JW, Dec J, Kim JE, Bollag JM (2000) Transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of humic acid. *J Environ Qual* 29:214–220
- Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534–540
- Pennathur S, Maitra D, Byun J, Sliskovic I, Abdulhamid I, Saed GM, Diamond MP, Abu-Soud HM (2010) Potent antioxidative activity of lycopene: a potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 49:205–213
- Petroutsos D, Katapodis P, Samiotaki M, Panavotou G, Kekos D (2008) Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69:707–714
- Pierre JL, Fontecave M (1999) Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biometals* 12:195–199
- Popp P, Bruggemann L, Keil P, Thuss U, Weiss H (2000) Chlorobenzenes and hexachlorocyclohexanes (HCHs) in the atmosphere of Bitterfeld and Leipzig (Germany). *Chemosphere* 41:849–855
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couee I, Gouesbet G (2009) Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol* 9:28–46
- Rouhier N, Koh CS, Gelhaye E, Corbier C, Favier F, Didierjean C, Jacquot JP (2008) Redox based anti-oxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochim Biophys Acta* 1780:1249–1260
- Schroll R, Scheunert I (1992) A laboratory system to determine separately the uptake of organic chemicals from soil by plant roots and by leaves after vaporization. *Chemosphere* 24:97–108
- Sinha S (2002) Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46:281–288
- Sunohara Y, Matsumoto H (2008) Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry* 69:2312–2319
- Talano MA, Frontera S, Gonzalez P, Medina MI, Agostini E (2010) Removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *J Hazard Mater* 176:784–791
- Tam DD, Shiu WY, Qiang K, Mackay D (1996) Uptake of chlorobenzenes by tissues of the soybean plant: equilibria and kinetics. *Environ Toxicol Chem* 15:489–494
- Wang MJ, Jones KC (1994a) Occurrence of chlorobenzenes in 9 United-Kingdom retail vegetables. *J Agric Food Chem* 42:2322–2328
- Wang MJ, Jones KC (1994b) Behavior and fate of chlorobenzenes (CBs) introduced into soil–plant systems by sewage-sludge application—a review. *Chemosphere* 28:1325–1360
- Wang MJ, Bokern M, Boehme C, Jones KC, Harms H (1996) Phytotoxicity, uptake and metabolism of 1,4-dichlorobenzene by plant cells. *Environ Toxicol Chem* 15:1109–1114
- Wrona M, Wardman P (2006) Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 41:657–667
- Zhang JY, Zhao W, Pan J, Qiu LM, Zhu YM (2005) Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environ Int* 31:855–860
- Zhou X, Deng SB, Huang J, Yu G, Lv HL (2009) Occurrence and distribution of chlorobenzenes in the Tonghui river of Beijing, China. *Arch Environ Contam Toxicol* 57:32–41
- Zimmermann P, Zentgraf U (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol Lett* 10:515–534

Publication 2

Dose responses to organochlorines in *Phragmites australis*

Mathieu Faure, Angélique San Miguel, Patrick Ravanel, Muriel Raveton*

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53,
38041 Grenoble Cedex 09, France.

*Author for correspondence:

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53,
38041 Grenoble Cedex 09, France. E-mail: muriel.raveton@ujf-grenoble.fr

Abstract

Plant tolerance to chemicals is a prerequisite for the successful application of phytoremediation processes. In constructed wetlands, *Phragmites australis* is a common macrophyte showing potential for the phytoremediation of chlorinated chemicals. In this study, an investigation was made of the phytotoxic response of *P. australis* when it is exposed to the organochlorine (OC) pesticide lindane (HCH) and to three of its metabolites [monochlorobenzene (MCB), 1,4-dichlorobenzene (DCB), 1,2,4-trichlorobenzene (TCB)], under conditions of single and multiple exposure. To this end, both physiological (growth, chlorophyll content) and biochemical (peroxidase (POD) and glutathione-reductase (GR) activities) parameters were measured. Under single exposure conditions, each congener tested showed a no-observed-effect-concentration (NOEC_{7d}) that was 1,000 to 300,000 times higher than environmental concentrations. *P. australis* demonstrated a significantly high tolerance to these OCs. Nevertheless, at the NOEC_{7d} level of each congener (0.8 mg l⁻¹ MCB + 0.8 mg l⁻¹ DCB + 10 mg l⁻¹ TCB + 0.7 mg l⁻¹ HCH), the combined OC mixture induced a synergistic toxic effect, causing a severe drop (70%) in chlorophyll content. This mixture was 60 times more concentrated than environmental OC mixtures measured in surface waters (about 0.2 mg l⁻¹). A mixture containing 0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH, that was 15 times more concentrated than environmental OC mixture, did not cause phytotoxicity after 21 days of exposure. Furthermore, the OC mixture had a significant effect on POD and GR activities immediately after the start of exposure (3 days), but the plants showed no signs of stress thereafter. Taken together, these data suggest that OC mixtures at environmentally relevant concentrations do not pose a significant risk to the aquatic macrophyte, *P. australis*.

Keywords: Organochlorines; *Phragmites australis*; Pollutant mixture; Phytotoxicity; Oxidative stress ; Phytoremediation.

1 Introduction

The Stockholm Convention seeks the elimination of 12 chemicals or classes of chemicals, one of which is lindane (γ -hexachlorocyclohexane, HCH) (Vijgen et al., 2011). Produced mainly during the period between the end of World War II and the 1990s, HCH was one of the most extensively used organochlorine (OC) pesticides, designed to control a wide range of agricultural, horticultural and public health pests. The application of HCH has resulted in environmental contamination of global dimensions and its high stability has generated serious problems in a variety of circumstances around the world (Vijgen et al., 2010). Awareness of the consequences of HCH exposure for both human and environmental health has led to its use being banned in at least 52 countries (Vijgen et al., 2010). The concentrations of HCH isomers detected in soils around the world range from 4 to 125,280 mg kg⁻¹. The most contaminated areas to be found tend to be former industrial sites, waste disposal sites and, finally, agricultural soils (Abhilash and Singh, 2010). Moreover, HCH residues at many sites have percolated through the soil and contaminated the groundwater, *e.g.* contamination levels of up to 730 $\mu\text{g l}^{-1}$ from an industrial point source in Germany (Ricking and Schwarzbauer, 2008). The presence of environmental residues of HCH isomers has now been reported for many countries and the existence of contamination in water and in sediments has been established (Lal et al., 2010). Environmental levels of ΣHCH isomer contamination vary, ranging from 0.41 to 2.8 ng l⁻¹ in surface waters, for example (Marvin et al., 2004). Sediment contamination levels also range from 1.95 to 11.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Turgut, 2005), and can be as high as 396 $\mu\text{g kg}^{-1}$ near industrial areas (Ricking and Schwarzbauer, 2008).

The distribution of HCH in the environment has led to contamination of the anaerobic and aerobic compartments in which microbial biodegradation occurs (Lal et al., 2010). Several studies have reported the production of chlorobenzenes (CBs) by microorganisms during the anaerobic degradation of HCH and, in a minority of cases, during the aerobic pathway (Lal et al., 2010, Ricking and Schwarzbauer, 2008). Under anaerobic conditions, the major pathway of reductive dechlorination of HCH is as follows: HCH \rightarrow tetrachlorocyclohexene \rightarrow dichlorocyclohexadiene \rightarrow monochlorobenzene (MCB). The most frequently observed pathway under aerobic conditions is as follows: HCH \rightarrow pentachlorocyclohexene \rightarrow tetrachlorocyclohexadiene \rightarrow 1,2,3-trichlorobenzene (TCB) and 1,2,4-TCB \rightarrow dichlorobenzene (DCB). Of the three DCB congeners, 1,4-DCB is the most commonly detected (Adrian et al., 2000). TCB and DCB seem to be the end products of dechlorination, and may accumulate in the natural environment (Fathepure et al., 1988). These CBs are

relatively volatile and chemically stable, with high *n*-octanol-water partition coefficients, and, as a consequence, bioaccumulation may be expected in organisms (Malcolm et al., 2004). Concentrations of CBs in the environment vary, ranging from 0.07 to 34.79 ng l⁻¹ in water from industrial catchments (Meharg et al., 2000), from 89.9 to 6,638 ng l⁻¹ for Chinese urban drainage (Zhou et al., 2009) and from 0.4 to 5.8 µg kg⁻¹ in sediments (Lee et al., 2000). CB levels in soils depend on the area, with total CB concentrations ranging from less than 0.4 mg kg⁻¹ in environmental soils (Wang et al., 1996) to 1.5-18,400 mg kg⁻¹ in former industrial factories (Feidieker et al., 1995).

Phytoremediation is a cost-effective and environmentally friendly technology for the decontamination of soils and sediments, and could potentially be applied to large-scale areas (Haberl et al., 2003; Schroeder et al., 2007). The use of plants for the purposes of phytoremediation has two potential advantages, (1) plant roots exude natural carbon sources that could enhance the growth of various types of organic-contaminant-degrading bacteria (Kidd et al., 2008) and, (2) plants could also take up organic contaminants (the phytoextraction process) (Gomez-Hermosillo et al., 2006). Some studies have reported plants with a high level of bioaccumulation of OCs from contaminated soils (Wang et al., 1996). HCH and CB uptake has been reported in different studies, both by crop plants (Kraaij and Connell, 1997; Zhang et al., 2005) and wetland plants (Ma and Burken, 2002; Sinha, 2002; Miglioranza et al., 2004; Gomez-Hermosillo et al., 2006; Monferran et al., 2007; Ma and Havelka, 2009). Bioaccumulation seems to be correlated with soil or sludge contamination, the physiological characteristics of the plants, the lipid content of plant tissue and the partition coefficient of the OCs (Zhang et al., 2005). Wetland plants such as *Phragmites communis* and *Typha angustifolia* have shown a potential for the phytoremediation of chlorinated contaminants (Ma and Havelka, 2009).

A prerequisite for the successful application of phytoremediation technologies is the healthy growth of plants. The presence of a wide variety of pollutants in the environment poses the question of their combined effects on exposed plants. A lack of understanding of the phytotoxicity of exposure to mixed pollutants hampers efforts to analyse the effect of such environmental factors on macrophytes, which seem to be highly efficient at phytoremediation. The objective of this study has been to determine the phytotoxicity (biomass, chlorophyll content) of HCH and its CB metabolites (MCB, DCB, TCB) with respect to *Phragmites australis*, with each compound being tested both as a single pollutant and as a component of a mixture of all these compounds. A special analysis of the antioxidant systems (peroxidases,

glutathione reductase) involved in counteracting chlorinated compound effects has been made. The overall aim was to determine whether *Phragmites australis* would be suitable for use in future phytoremediation applications in sediments and/or water contaminated by OCs.

2 Materials and methods

2.1. Chemicals

The chemicals used in this study were MCB (monochlorobenzene), DCB (1,4-dichlorobenzene), TCB (1,2,4-trichlorobenzene) and HCH (γ -hexachlorocyclohexane). These were purchased from Sigma-Aldrich (Germany) as pure standards (99% purity). MCB was provided directly solubilised in methanol.

2.2. Plant material, growth conditions and exposure times

Phragmites australis plants were purchased from *La ferme de Chosal* (Annecy, France). The plants were nursery grown and delivered in 10 x10 cm containers. Plants were washed to eliminate soil and were then grown hydroponically (Hoagland nutritive solution, renewed every week). After at least 3 weeks of cultivation under controlled conditions (16:8h light:dark; $70 \pm 5\%$ relative humidity; $25 \pm 2^\circ\text{C}$; $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation), plants showing healthy growth were selected for further experimentation. Plants were exposed to a range of OC concentrations over a period of 7 days, i.e., MCB (0.8 to 80 mg l^{-1}), DCB (0.8 to 80 mg l^{-1}), TCB (10 to 40 mg l^{-1}) and HCH (0.7 to 7 mg l^{-1}). Gains in biomass were determined by fresh weight measurements (before treatment and after 7 days of exposure, $n = 10$). After this, plants were exposed to a mixture of MCB, DCB, TCB and HCH (the concentration of each congener was fixed after determining the individual no-observed-effect concentration). *P. australis* plants were exposed to the tolerated mixture of OCs for 21 days, with plants being collected every 3, 7, 14 and 21 days.

2.3. Chlorophyll content

After each treatment, the youngest leaves (10 mg) of exposed and unexposed plants were collected ($n = 5$). Leaves were ground in presence of ethanol (1 ml) and mixture was centrifuged (10,000 rpm, 2 min). The supernatant was collected for measurement of absorbance at 645 nm and 663 nm. The following equations were used to calculate the contents of chlorophyll *a* and *b* and total content ($\mu\text{g mg}^{-1}$) (Porra, 2002):

$$[\text{Chl } a] = (16.29 A_{665} - 8.54 A_{652}) \times \text{Total volume} / \text{Fresh weight} \quad \text{Eq.1}$$

$$[\text{Chl } b] = (30.66 A_{652} - 13.58 A_{665}) \times \text{Total volume} / \text{Fresh weight} \quad \text{Eq.2}$$

$$[\text{Chl } a + b] = (22.12 A_{652} + 2.71 A_{665}) \times \text{Total volume} / \text{Fresh weight} \quad \text{Eq.3}$$

2.4. Enzyme assays

Fresh organs (roots, rhizomes, leaves) were frozen in liquid nitrogen immediately after harvesting and stored at -80°C. The organs were ground in K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer (1/3, w/v; 50 mM, pH 7), which included 10% (w/v) polyvinylpyrrolidone. The homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C (Landberg and Greger, 2002). The supernatant was used for enzyme activity and protein content assays (determined according to the method described by Bradford, using BSA as a standard). All spectrophotometric analyses were conducted using a Varioskan flash spectrophotometer (n = 5).

Guaiacol peroxidase activity (POD; EC 1.11.1.7) was measured according to Landberg and Greger (2002). The activity was assayed for 10 min (with measurements every minute) in a reaction solution (200 µl final volume; 96-well microplates) comprising 10 mM H₂O₂ and 9 mM guaiacol in 25 mM potassium buffer (pH 7.0) and 2.5 µg or 10 µg proteins, for root, rhizome and leaf enzyme extracts, respectively. Absorbance was measured at 470 nm ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) catalyses the reduction of GSSG to GSH (one mole of NADPH is required to reduce one mole of GSSG). GR activity was therefore determined by measuring the decrease in NADPH concentration at 340 nm. The reaction mixture contained 25 mM K-phosphate buffer (pH 7.8), 5 mM GSSG, 1.2 mM NADPHNa₄ and 50 µg protein (200 µl final volume; 96-well microplates). The reaction was measured every 2 min for a period of 10 min and GR activity was calculated from the reduced GSSG concentration, using the NADPH extinction coefficient $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Murshed et al., 2008).

2.5. Statistical analyses

For each parameter measured (biomass, chlorophyll, enzymatic activities), Mann-Whitney tests (n = 5, non-parametric) were applied, in order to estimate the effects of OC exposure on plants. It has been verified that ethanol and methanol controls did not present significant differences. Thus, the controls have been reported as the mean \pm standard error of both controls for each measured parameter.

3 Results

3.1. Plant responses to OCs under single-exposure conditions

Growth parameters were monitored by measuring biomass gains in *P. australis* both before and after exposure to the pollutant. After 7 days of exposure, plant biomass was affected by very high concentrations of OCs; 80, 80, 40, and 7 mg l⁻¹ concentrations of MCB, DCB, TCB and HCH, respectively, induce an 80% decrease (EC₈₀). Moreover, morphological symptoms, including chlorosis, followed by wrinkling of the leaves, were noted on the leaves. In addition, plants exposed to these EC₈₀ concentrations showed induced POD activities in roots [30 % ($p = 0.0415$) with HCH and 25 % ($p = 0.0495$) with TCB] and GR activities in roots (50%, $p = 0.009$) and in leaves (15%, $p = 0.0446$) with HCH (results not shown). On the basis of morphological criteria, the lowest concentrations did not cause significant differences in biomass gain, but they did significantly decrease chlorophyll content (Fig. 1).

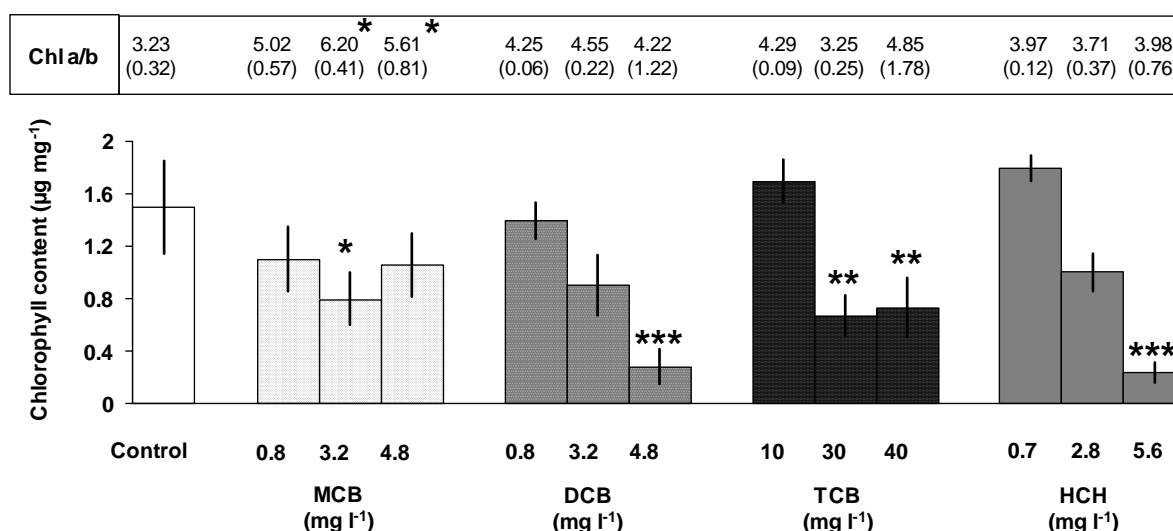


Figure 1 : Chlorophyll content and chlorophyll *a/b* ratios in the leaves of *Phragmites australis* plants under exposure to organochlorines.

Each value is the mean \pm SE ($n = 5$). The asterisks indicate values that differ significantly from the control; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

The chlorophyll content of plants exposed to 3.2 mg l⁻¹ MCB decreased by 44%, compared to the controls. The chlorophyll *a/b* ratio showed a significant increase, being twice the ratio measured in controls. The chlorophyll *b* content decreased by 57% ($p = 0.0495$). Exposure to DCB, TCB and HCH induced the same pattern of chlorophyll content decrease, while the chlorophyll *a/b* ratios were not affected. Exposure of plants to DCB (3.2 mg l⁻¹), TCB (30 mg l⁻¹) and HCH (2.8 mg l⁻¹) caused a 30% ($p = 0.045$), 50% and 60% ($p = 0.013$) decrease in

chlorophyll, respectively, compared to controls. Thus, the pollutant concentrations for which plants did not show physiological perturbations were 0.8 mg l⁻¹ MCB, 0.8 mg l⁻¹ DCB, 10 mg l⁻¹ TCB and 0.7 mg l⁻¹ HCH. Moreover, at these OC concentration exposures, antioxidative enzyme activities were not affected to any great extent (Fig.2).

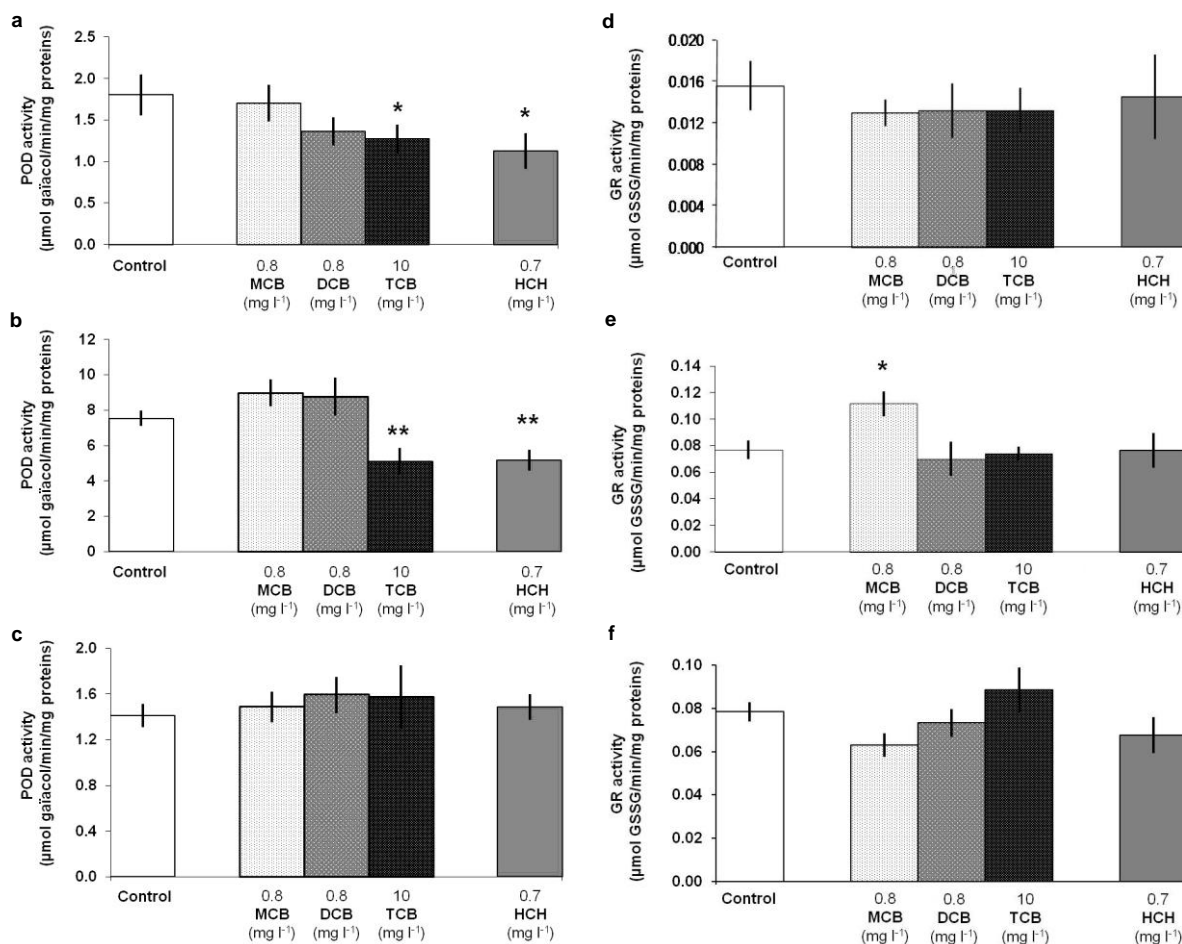


Figure 2 : Effects of organochlorine exposure at NOEC_{7d} level on the activities of POD (a,b,c) and GR (d,e,f) in the roots (a,d), the rhizomes (b,e) and the leaves (c,f) of *Phragmites australis*.

Each value is the mean \pm SE (n = 5). * and ** indicates the significant difference from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

In roots and rhizomes, POD activities decreased significantly (30%, $p = 0.032$ and $p = 0.01$, respectively) in response to HCH exposure and the same trend was observed for TCB (25% decrease, $p = 0.043$ and $p = 0.01$) (Fig. 2a, b). POD activities in leaves were not affected by OC exposure (Fig. 2c) and GR activities were not affected by OC exposure in any of the organs studied (Fig. 2d, e, f). The only significant GR activity induction (30%, $p = 0.0275$) was measured in rhizomes exposed to MCB. Overall, it was shown that OC exposure (single-exposure: 0.8 mg l⁻¹ MCB, 0.8 mg l⁻¹ DCB, 10 mg l⁻¹ TCB and 0.7 mg l⁻¹ HCH) did not

induce extreme stress in *P. australis*, since analyses of growth, physiological and biochemical parameters measured show any major perturbations in their function.

3.2. Plant responses to mixtures of OCs

The first OC mixture (MIX1) comprised levels of each congener that had not induced phytotoxicity under conditions of single-exposure: 0.8 mg l⁻¹ MCB + 0.8 mg l⁻¹ DCB + 10 mg l⁻¹ TCB + 0.7 mg l⁻¹ HCH. *P. australis* plants that were exposed to MIX1 for 7 days did not show any growth inhibition, but leaf chlorosis was observed. MIX1 caused a 70% ($p = 0.045$) decrease in chlorophyll content, with a change in the chlorophyll *a/b* ratio, although not significant (Fig. 3).

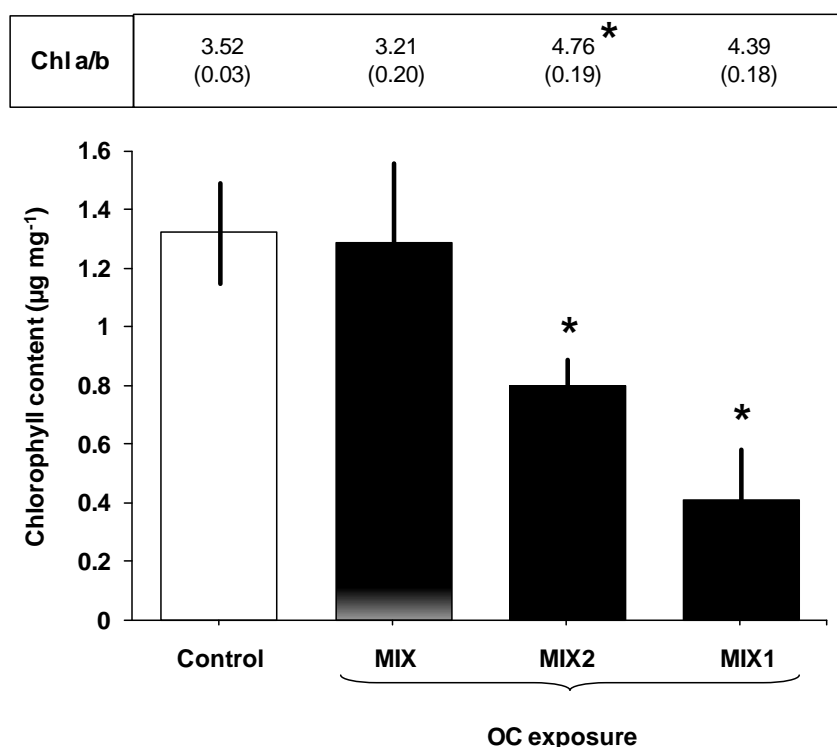


Figure 3 : Chlorophyll content and chlorophyll *a/b* ratios in the leaves of *Phragmites australis* plants exposed to organochlorine mixtures.

Each value is the mean \pm SD ($n = 5$). * indicates the significant difference from the control at $p < 0.05$. **MIX1** = 0.8 mg l⁻¹ MCB + 0.8 mg l⁻¹ DCB + 10 mg l⁻¹ TCB + 0.7 mg l⁻¹ HCH; **MIX2** = 0.4 mg l⁻¹ MCB + 0.4 mg l⁻¹ DCB + 5 mg l⁻¹ TCB + 0.35 mg l⁻¹ HCH; **MIX** = 0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH

Subsequently, a new OC mixture (MIX2) was tested in which the concentration of each congener was two times lower than in MIX1. MIX2 also caused a decrease in the chlorophyll content (40%; $p = 0.045$) and a significant change in the chlorophyll *a/b* ratio (apparently due

to an increase in the chlorophyll *a* content). The final OC mixture tested (MIX: 0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH) had no effect on chlorophyll synthesis during 7 days of exposure.

3.3.Plant responses to mixed pollution over time

The OC mixture (MIX) that produced no observable effects on *P. australis* after 7 days was tested for periods of 3, 7, 14 and 21 days of exposure. Growth development parameters (biomass, total protein content, chlorophyll content) were measured to determine phytotoxicity (Fig. 4).

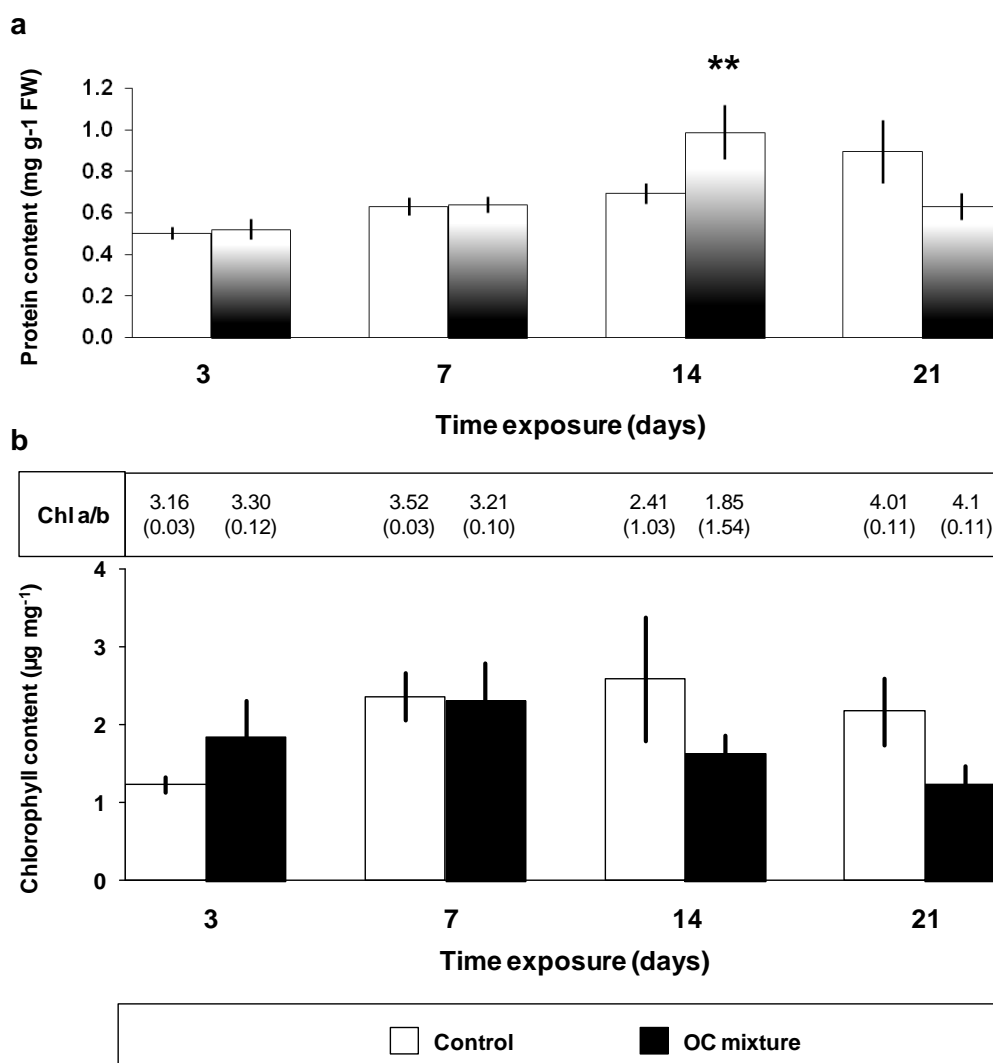


Fig.4. Protein (a) and chlorophyll (b) contents in *P. Australis* plants exposed to an OC mixture for 21 days. OC mixture tested: 0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH. Each value is the mean \pm SD (n = 5). ** indicates the significant difference from the control at $p < 0.01$.

Under these exposure conditions, the plants exhibited only minor growth retardation (relative to controls) over a 21-day period of exposure to the applied OC mixture. Over this exposure period, the plants gained approximately 8-9% in weight (10-11% for controls). There was no obvious sign of phytotoxicity exhibited in response to this mixture of OCs, with a significant increase in protein content ($p = 0.088$) at 14 days (which was not maintained after 21 days) (Fig. 4a). In contrast, the effects of the applied OC mixture on chlorophyll content were more distinctive (Fig. 4b). There was a non-significant decrease in chlorophyll content when plants were exposed for up to 14 and 21 days (a 35% and 40% decrease, respectively, compared to the control). This decrease was not correlated with a change in the chlorophyll *a/b* ratios.

POD and GR activities differed in roots, rhizomes and leaves exposed to OCs. Significant changes were observed at 3 days of OC-exposure (Fig. 5), with a significant induction (40%, $p = 0.036$) of POD activity and a significant depletion (50%, $p = 0.036$) of GR activity in roots (Fig. 5a, d). A similar pattern of POD (10% increase, non-significant) and GR (30% decrease, $p = 0.025$) activity was measured in rhizomes (Fig. 5b, e). In leaves, the trend was reversed, with an induction of GR activity (40%, $p = 0.036$), while POD activity was similar to the controls (Fig. 5c, f). After 3 days of exposure, POD and GR activities were similar to those measured in the controls.

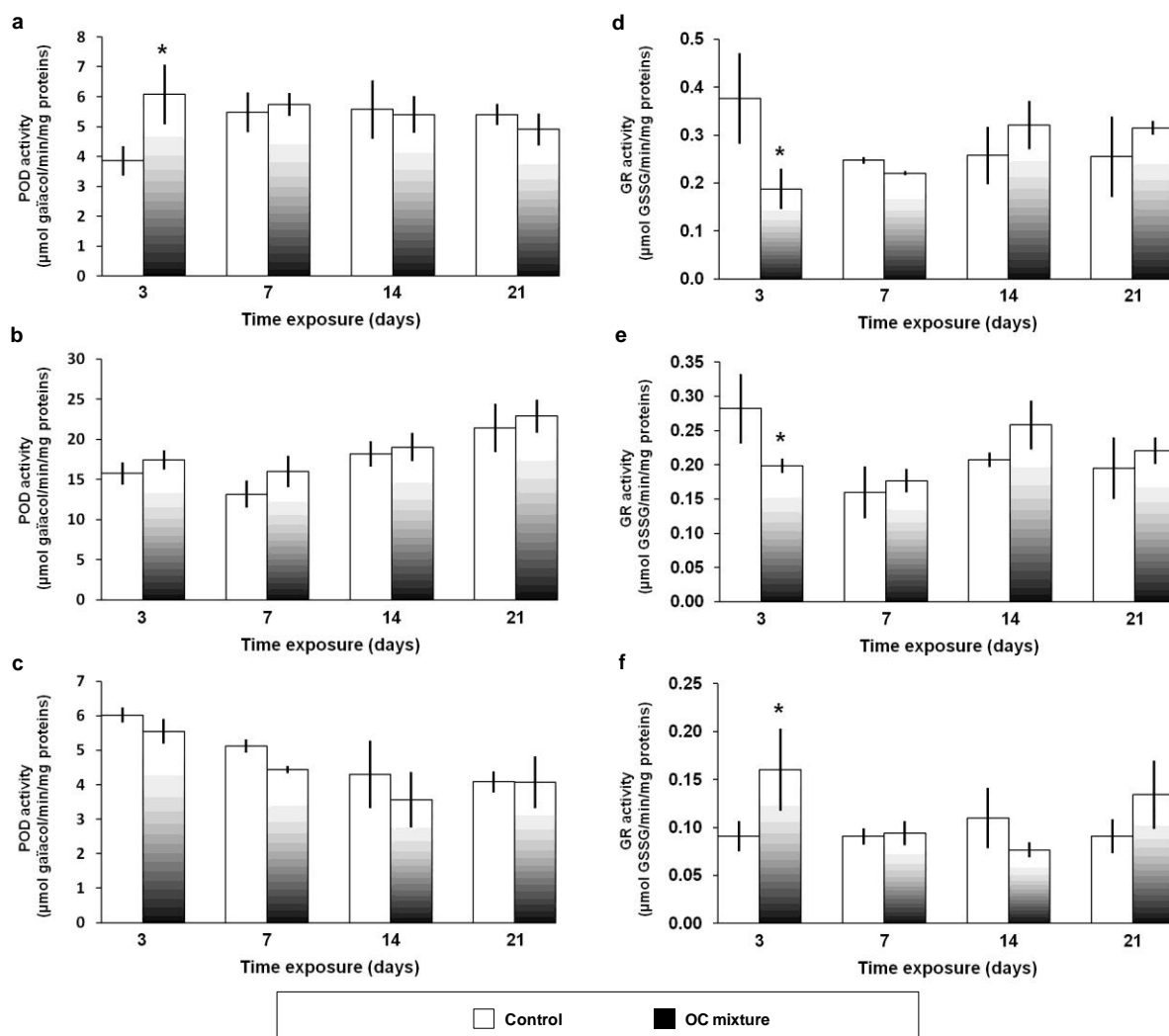


Fig.5. Effects of OC mixture exposure for 21 days on POD (a,b,c) and GR (d,e,f) activities in *Phragmites australis* roots (a,d), rhizomes (b,e) and leaves (c,f). OC mixture tested: 0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH. Each value is the mean ± SD (n = 5). * indicates the significant difference from the control at $p < 0.05$.

4 Discussion

Environmental organic pollutants such as organochlorines (OCs) may cause a variety of forms of physiological or oxidative stress in plants, which may compromise the success of phytoremediation. The most common symptom of phytotoxicity under such forms of stress is the inhibition of growth (Monferran et al., 2007; Menone et al., 2008; Pereira et al., 2010). Since growth inhibition is a global parameter, it has been confirmed that pigment content values (chlorophyll *a*, *b*) may be used as reliable indicators of pollutant toxicity (Ralph et al., 2007). Inhibition of chlorophyll content has been observed in *Anabaena* exposed to OCs such as HCH and propronil (Babu et al., 2005). Moreover, HCH has been described as inhibiting photosystem II complexes by inhibiting the reduction of the primary bound plastoquinone by the excited reaction center (Bueno et al., 2004). Thus, these morphological and physiological indicators were chosen as suitable parameters for assessing macrophyte (*Phragmites australis*) tolerance to OC exposure. In this study, significant growth inhibition and chlorophyll content inhibition were observed with plants exposed to monochlorobenzene (MCB), dichlorobenzene (DCB), trichlorobenzene (TCB) and lindane (HCH) concentrations higher than 10 mg l⁻¹. Moreover, there is growing evidence indicating that OCs are able to induce the intracellular over-production of reactive oxygen species (ROS), thus damaging plant cells (Liu et al., 2005; Monferran et al., 2007; Menone et al., 2008; San Miguel et al., 2011). Plant cells have developed defense systems in order to protect against ROS-induced oxidative damage, including such antioxidant enzymes as peroxidases (POD) and glutathione reductase (GR) (Mittler et al., 2004; Passardi et al., 2004; Foyer and Noctor, 2005; Rouhier et al., 2008). In this study, a significant induction of scavenging enzymes (POD, GR) due to TCB and HCH exposure, in OC-exposed plants, occurred. Interestingly, the lowest doses of TCB and HCH (10 mg l⁻¹ and 0.7 mg l⁻¹) caused a significant drop in POD activity in roots and rhizomes (Fig. 2). This may be explained by the hormesis phenomenon that has been reported in different plants exposed to chlorine aromatic hydrocarbons (Calabrese and Baldwin, 2002; Menone and Pflugmacher, 2005; Monferran et al., 2007). The no-observed-effect concentrations, after 7 days of exposure (based on growth, chlorophyll, POD and GR criteria) were 0.8 mg l⁻¹ MCB, 0.8 mg l⁻¹ DCB, 10 mg l⁻¹ TCB and 0.7 mg l⁻¹ HCH. The same levels of threshold concentrations have been measured previously with other plant species (*e.g.* algae (Babu et al., 2005) and crop plants (Pereira et al., 2010; San Miguel et al., 2011)). These concentrations are higher than the environmental concentrations (7 days) commonly detected in surface waters, in the ppt to ppb range (Malcolm et al., 2004; Marvin et al., 2004).

These OC environmental exposures should not induce drastic phytotoxic effects, since concentrations are 1,000 to 300,000 times lower than the no-observed-effect concentrations measured under our laboratory conditions. In industrial areas, these measured OC threshold concentrations are two to ten times higher than OC concentrations measured in surface waters (Malcolm et al., 2004). Overall, *Phragmites australis* seems to be tolerant to elevated OC concentrations tested under single-exposure conditions, and would be adapted to the treatment of OCs at environmental concentration levels.

OCs are rarely detected as single compounds in environmental samples. Most studies find numerous chlorinated compounds in the samples (soils, sediments, waters) collected (Feidieker et al., 1995; Meharg et al., 2000; Lal et al., 2010). Complex mixtures of organic pollutants have the potential for interactions that are additive in most cases, although synergistic or antagonistic interactions are also possible (Hertzberg and MacDonell, 2002). Previous studies have shown that triazines and organophosphates can act synergistically, resulting in higher toxicity at species level than would be expected from exposure to each compound separately (Schuler et al., 2005; Belden and Lydy, 2006). Other studies dealing with mixtures of chlorinated pollutants (e.g. trichloroacetic acid/trifluoroacetic acid; chlorpyrifos/HCH) have indicated no antagonistic or synergistic effects at community level (Hanson et al., 2002; Van den Brink et al., 2002). In this study, the joint action of the OC mixture at the no-observed-effect concentrations of the individual compounds (0.8 mg l^{-1} MCB + 0.8 mg l^{-1} DCB + 10 mg l^{-1} TCB + 0.7 mg l^{-1} HCH) caused a severe drop in chlorophyll content (70%) after 7 days of exposure. The OC mixture displayed a synergistic toxic effect on *Phragmites australis*. Despite the literature referring to synergism in organisms, the physiological mechanisms by which one pollutant synergizes another remain unclear. The general theory is that synergism may result from the ability of one molecule to interfere with the metabolic detoxification of another (Corbett et al., 1974). However, in the example of the joint toxicity of the chloro_n-ethylene congener mixture, the parent chemicals and the metabolites are toxic, but to different target organs and with different endpoints, so that metabolic inhibition/induction is able to increase or decrease overall toxicity (El-Masri et al., 1996). In case of chlorobenzenes, previous studies have shown that plant phytotoxic effects are linked to the benzene's degree of chlorination (San Miguel et al., 2011). It has been suggested that during detoxification of the chlorinated compounds, peroxidase (Talano et al., 2010) and monooxygenase P450 (Hatzios and Burgos, 2004) pathways could be involved in

dehalogenation pathway, leading to the loss of Cl^- atoms. Furthermore, superoxide and hydrogen peroxide can displace chloride ions from chlorinated compounds, generating secondary radicals (Sinha, 2002; Pennathur et al., 2010). Thus, we hypothesize that the joint toxicity of the OC mixture may be related to the ROS and free radicals that are generated in greater amounts from chlorinated parent chemicals. In addition, the detoxification pathways (peroxidases, P450) would produce chloro_n-phenol compounds (Wang et al., 1996), which might cause supplementary phytotoxic damage (Biswas et al., 2010). Further investigation of the composition of the OC mixture (modulation of the concentration of each congener) is necessary in order to understand the nature of the synergistic effects on plant damage.

The OC mixture that caused no observed effect over a short, 7-day, exposure time ($\text{NOEC}_{7\text{d}}$ for chlorophyll content and quality) in *Phragmites australis* contained 0.2 mg l^{-1} MCB + 0.2 mg l^{-1} DCB + 2.5 mg l^{-1} TCB + 0.175 mg l^{-1} HCH. This mixture was tested on macrophytes for a long exposure time of 21 days, and various toxicity parameters (protein and chlorophyll contents, POD, GR) were monitored. At 3 days of exposure, the activities of POD and GR were affected significantly, compared to the untreated plants. In roots, POD activity was induced to a significant extent, possibly indicating an excessive accumulation of H_2O_2 in these organs, linked to OC exposure. In contrast, GR activity in roots and rhizomes decreased significantly, compared to untreated plants, which might be attributed to the hormesis phenomenon (Calabrese and Baldwin, 2002; Menone and Pflugmacher, 2005; Monferran et al., 2007). GR activity was induced to a significant extent in leaves, which might reflect the need to restore the oxidative balance between GSH and GSSG, a ratio that could be altered due to (1) ROS scavenging (e.g., the H_2O_2 that is produced by OCs and/or their metabolites reaching the leaves), and/or (2) glutathione S-transferase (GST) detoxification pathways (e.g., GST activity could be involved in the detoxification of peroxides (Cummins et al., 1999)) and/or (3) in the conjugation of chlorinated compounds with GSH (Marcacci et al., 2006; Petroutsos et al., 2008). When *P. australis* plants are exposed to the OC mixture for more than 3 days, biomass, chlorophyll and protein contents and POD and GR activities in roots, rhizomes and leaves were at the same level as in untreated plants, which indicates that the detoxification system of the plants functions well. These findings therefore demonstrate the efficiency of *P. australis* in tolerating exposure to the OC mixture for one month of exposure. The concept of using constructed wetlands for the treatment of several kinds of industrial wastewater has received a great deal of attention, the aim being to eliminate recalcitrant organic substances such as petrochemicals, aromatics (chlorinated, nitrobenzenes,...) and

glycols (Haberl et al., 2003; Braeckevelt et al., 2007; Imfeld et al., 2009; Cottin and Merlin, 2010). Specific studies using *Phragmites* spp. exposed to chlorobenzenes have shown its potential for phytoremediation, with a threshold TCB concentration of $1,575 \text{ mg kg}^{-1}$ dry sediment (Ma and Havelka, 2009). In areas close to industrial sources, the maximum environmental concentrations in surface waters have been shown to be as high as 0.2 mg l^{-1} of $\Sigma\text{HCH} + \Sigma\text{CB}$ (Malcolm et al., 2004). Using a hazard quotient risk assessment, where a measured environmental concentration (*MEC*) is divided by a toxicological benchmark concentration (*tbc*) (Suter, 1995), with $3 \text{ mg l}^{-1} \Sigma\text{HCH} + \Sigma\text{CBs}$ as the *tbc* (= NOEC based on chlorophyll content after 21 days of exposure) and 0.2 mg l^{-1} the maximum *MEC*, the hazard quotient obtained is 0.07. Using this quotient, environmental concentrations of the OC mixture ($\Sigma\text{HCH} + \Sigma\text{CBs}$) do not represent an acute risk of toxicity with respect to these macrophytes. Moreover, specific studies using pilot-scale constructed wetlands that have been unplanted and planted with *Phragmites* spp., have shown that the removal of CBs was more effective in the planted pilot, thus demonstrating the enhancement of contaminant removal by these plants (Braeckevelt et al., 2008). This plant's high tolerance to OCs, associated with its effective potential for phytoextraction, is a prerequisite for its successful application in phytoremediation technologies.

5 Conclusions

Exposing *Phragmites australis* plants to HCH and three of its metabolites (MCB, DCB, TCB) as single pollutants caused obvious toxic symptoms for concentrations above 0.8 mg l^{-1} MCB, 0.8 mg l^{-1} DCB, 10 mg l^{-1} TCB and 0.7 mg l^{-1} HCH. At this level of concentrations, antioxidant POD activities fell slightly in roots and rhizomes; this may be the first line of defense against OC stress. Nevertheless, under environmental conditions, plants are exposed to mixtures of pollutants. Our findings concerning the toxicity of an OC mixture in *P. australis* have revealed that synergism between OCs may occur, possibly due to enzymatic competition between components and/or synthesis of toxic metabolites leading to the release of ROS and free radicals. Further experimentation is needed concerning the composition of the OC mixture, in order to understand the nature of synergistic effects with respect to plant damage. The OC mixture (0.2 mg l^{-1} MCB + 0.2 mg l^{-1} DCB + 2.5 mg l^{-1} TCB + 0.175 mg l^{-1} HCH) that did not cause obvious phytotoxicity was tested on *P. australis* plants for a long exposure time (21 days). At 3 days of exposure, antioxidant enzyme activity results testified

to the fact that the plants are involved in a defense mechanism against the stress induced by the OC mixture. However, after this period, the exposed plants developed as healthily as untreated plants (according to physiological and biochemical criteria). These findings, therefore, have demonstrated how efficiently *P. australis* tolerates the OC mixture for one month of exposure. Such an OC mixture provides a hazard quotient of 0.07. These results therefore indicate that the phytotoxic effects of the OC mixture on *P. australis* are unlikely to occur under normal environmental conditions.

Acknowledgements

This work is part of VALORSITE-PHYCO project funded by AXELERA. We are especially grateful to Martha and John Willison for improving the English text.

References

- Abhilash, P.C., Singh, N., 2010. Effect of growing *Sesamum indicum* L. on enhanced dissipation of lindane (1, 2, 3, 4, 5, 6-hexachlorocyclohexane) from soil. *Int. J. Phytoremediat.* 12, 440-453.
- Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., Gorisch, H., 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408, 580-583.
- Babu, T.S., Tripuranthakam, S., Greenberg, B.M., 2005. Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1,2-dihydroxyanthraquinone: Synergistic toxicity via reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3030-3036.
- Belden, J.B., Lydy, M.J., 2006. Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 623-629.
- Biswas, D.K., Scannell, G., Akhmetov, N., Fitzpatrick, D., Jansen, M.A.K., 2010. 2,4,6-trichlorophenol mediated increases in extracellular peroxidase activity in three species of *Lemnaceae*. *Aquat. Toxicol.* 100, 289-294.
- Braeckevelt, M., Mirschel, G., Wiessner, A., Rueckert, M., Reiche, N., Vogt, C., Schultz, A., Paschke, H., Kusch, P., Kaestner, M., 2008. Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecol. Eng.* 33, 45-53.
- Braeckevelt, M., Rokadia, H., Imfeld, G., Stelzer, N., Paschke, H., Kusch, P., Kastner, M., Richnow, H.H., Weber, S., 2007. Assessment of *in situ* biodegradation of monochlorobenzene in contaminated groundwater treated in a constructed wetland. *Environ. Pollut.* 148, 428-437.
- Bueno, M., Fillat, M.F., Strasser, R.J., Maldonado-Rodriguez, R., Marina, N., Smienk, H., Gomez-Moreno, C., Barja, F., 2004. Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena* - Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP(+) reductase. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11, 98-106.
- Calabrese, E.J., Baldwin, I.A., 2002. Hormesis and high-risk groups. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35, 414-428.
- Corbett, J.R., Wright, K., Baillie, A.C., 1974. The biochemical mode of action of pesticides. New York: Academic Press, Inc., 330.
- Cottin, N., Merlin, G., 2010. Fate of chlorinated benzenes in laboratory peat and pozzolana filters. *Water Air Soil Pollut.* 213, 425-435.
- Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1999. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18, 285-292.
- El-Masri, H.A., Tessari, J.D., Yang, R.S.H., 1996. Exploration of an interaction threshold for the joint toxicity of trichloroethylene and 1,1-dichloroethylene: utilization of a PBPK model. *Archives of Toxicology* 70, 527-539.

- Fathpure, B.Z., Tiedje, J.M., Boyd, S.A., 1988. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to trichlorobenzenes and dichlorobenzenes in anaerobic sewage-sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 327-330.
- Feidieker, D., Kampfer, P., Dott, W., 1995. Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic-compounds and HCH in the subsurface environment *J. Contam. Hydrol.* 19, 145-169.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28, 1056-1071.
- Gomez-Hermosillo, C., Pardue, J.H., Reible, D.D., 2006. Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3229-3236.
- Haberl, R., Grego, S., Langergraber, G., Kadlec, R.H., Cicalini, A.R., Martins Dias, S., Novais, J.M., Aubert, S., Gerth, A., Thomas, H., Hebner, A., 2003. Constructed wetlands for the treatment of organic pollutants. *Journal of Soils and Sediments* 3, 109-124.
- Hanson, M.L., Sibley, P.K., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2002. Trichloroacetic acid (TCA) and trifluoroacetic acid (TFA) mixture toxicity to the macrophytes *Myriophyllum spicatum* and *Myriophyllum sibiricum* in aquatic microcosms. *Sci. Total Environ.* 285, 247-259.
- Hatzios, K.K., Burgos, N., 2004. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Sci.* 52, 454-467.
- Hertzberg, R.C., MacDonell, M.M., 2002. Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci. Total Environ.* 288, 31-42.
- Imfeld, G., Braeckevelt, M., Kusch, P., Richnow, H.H., 2009. Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74, 349-362.
- Kidd, P.S., Prieto-Fernandez, A., Monterroso, C., Acea, M.J., 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant Soil* 302, 233-247.
- Kraaij, H., Connell, D.W., 1997. Bioconcentration and uptake kinetics of chlorobenzenes in soy-bean roots. *Chemosphere* 34, 2607-2620.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, H.P.E., Holliger, C., Jackson, C., Oakeshott, J.G., 2010. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 58+.
- Landberg, T., Greger, M., 2002. Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *J. Plant Physiol.* 159, 69-75.
- Lee, C.L., Song, H.J., Fang, M.D., 2000. Concentrations of chlorobenzenes, hexachlorobutadiene and heavy metals in surficial sediments of Kaohsiung coast, Taiwan. *Chemosphere* 41, 889-899.
- Liu, W., Li, P.J., Zhou, Q.X., Sun, T.H., Tai, P.D., Xu, H.X., 2005. Short-term toxic effects of chlorobenzenes on broadbean (*Vicia faba*) seedlings. *Sci. China Ser. C-Life Sci.* 48, 33-39.
- Ma, X.M., Burken, J.G., 2002. VOCs fate and partitioning in vegetation: Use of tree cores in groundwater analysis. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4663-4668.
- Ma, X.M., Havelka, M.M., 2009. Phytotoxicity of Chlorinated Benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environ. Toxicol.* 24, 43-48.
- Malcolm, H.M., Howe, P.D., Dobson, S., 2004. Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene: Environmental aspects. World Health Organization, Concise International Chemical Assessment Document 60.
- Marcacci, S., Raveton, M., Ravanel, P., Schwitzguebel, J.P., 2006. Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environ. Exp. Bot.* 56, 205-215.
- Marvin, C., Painter, S., Williams, D., Richardson, V., Rossmann, R., Van Hoof, P., 2004. Spatial and temporal trends in surface water and sediment contamination in the Laurentian Great Lakes. *Environ. Pollut.* 129, 131-144.
- Meharg, A.A., Wright, J., Osborn, D., 2000. Chlorobenzenes in rivers draining industrial catchments. *Sci. Total Environ.* 251, 243-253.
- Menone, M.L., Pesce, S.F., Diaz, M.P., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A., 2008. Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry* 69, 1150-1157.

- Menone, M.L., Pflugmacher, S., 2005. Effects of 3-chlorobiphenyl on photosynthetic oxygen production, glutathione content and detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Chemosphere* 60, 79-84.
- Miglioranza, K.S.B., de Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., 2004. Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water Res.* 38, 1765-1772.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498.
- Monferran, M.V., Wunderlin, D.A., Nimptsch, J., Pflugmacher, S., 2007. Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68, 2073-2079.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H., 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal. Biochem.* 383, 320-322.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C., 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9, 534-540.
- Pennathur, S., Maitra, D., Byun, J., Sliskovic, I., Abdulhamid, I., Saed, G.M., Diamond, M.P., Abu-Soud, H.M., 2010. Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 205-213.
- Pereira, R.C., Monterroso, C., Macias, F., 2010. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* 79, 326-333.
- Petroutsos, D., Katapodis, P., Samiotaki, M., Panavotou, G., Kekos, D., 2008. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69, 707-714.
- Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73, 149-156.
- Ralph, P.J., Smith, R.A., Macinnis-Ng, C.M.O., Seery, C.R., 2007. Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. *Toxicol. Environ. Chem.* 89, 589-607.
- Ricking, M., Schwarzbauer, J., 2008. HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin, Germany. *Environ. Chem. Lett.* 6, 83-89.
- Rouhier, N., Koh, C.S., Gelhaye, E., Corbier, C., Favier, F., Didiejean, C., Jacquot, J.P., 2008. Redox based anti-oxidant systems in plants: Biochemical and structural analyses. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1780, 1249-1260.
- San Miguel, A., Faure, M., Ravanel, P., Raveton, M., 2011. Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichlorobenzenes. *Ecotoxicology in press*.
- Schroeder, P., Navarro-Avino, J., Azaizah, H., Goldhirsh, A.G., DiGregorio, S., Komives, T., Langergraber, G., Lenz, A., Maestri, E., Memon, A.R., Ranalli, A., Sebastiani, L., Smrcek, S., Vanek, T., Vuilleumier, S., Wissing, F., 2007. Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 14, 490-497.
- Schuler, L.J., Trimble, A.J., Belden, J.B., Lydy, M.J., 2005. Joint toxicity of triazine herbicides and organophosphate insecticides to the midge *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 173-177.
- Sinha, S., 2002. Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46, 281-288.
- Suter, G.W., 1995. Adapting ecological risk assessment for ecosystem valuation. *Ecol. Econ.* 14, 137-141.
- Talano, M.A., Frontera, S., Gonzalez, P., Medina, M.I., Agostini, E., 2010. Removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *J. Hazard. Mater.* 176, 784-791.
- Turgut, C., 2005. Uptake and modeling of pesticides by roots and shoots of parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12, 342-346.
- Van den Brink, P.J., Hartgers, E.M., Gylstra, R., Bransen, F., Brock, T.C.M., 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: II. Responses of plankton and ecological risk assessment. *Ecotoxicology* 11, 181-197.

- Vijgen, J., Abhilash, P.C., Li, Y.F., Lal, R., Forter, M., Torres, J., Singh, N., Yunus, M., Tian, C.G., Schaffer, A., Weber, R., 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 152-162.
- Zhang, J.Y., Zhao, W., Pan, J., Qiu, L.M., Zhu, Y.M., 2005. Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environ. Int.* 31, 855-860.
- Zhou, X., Deng, S.B., Huang, J., Yu, G., Lv, H.L., 2009. Occurrence and distribution of chlorobenzenes in the Tonghui River of Beijing, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 32-41.

Chapitre II

Mise en évidence de l'absorption des organochlorés (OCs) par la plante

I. Problématique et démarche de l'étude

La tolérance des plantes *P. australis* vis-à-vis des OCs ne permet pas de préjuger de leur potentiel de phytoextraction de ces polluants chlorés et/ou de leur dégradation. Plusieurs hypothèses peuvent-être avancées comme une phytostabilisation des polluants au niveau de la rhizosphère favorisant ainsi une rhizodégradation possible par la microflore associée aux racines, ou une phytoextraction des OCs par les racines puis un devenir au sein des tissus végétaux laissant supposer une potentielle translocation des OCs vers les parties aériennes, ou une phytovolatilisation potentielle liée au caractère volatile de certaines des molécules chlorées étudiées (MCB, DCB, TCB). L'absorption des OCs par les plantes a été démontrée chez diverses espèces végétales, essentiellement des plantes agronomiques (Wang and Jones 1994b, a, Tam et al. 1996, Kraaij and Connell 1997, Zhang et al. 2005); (Pereira et al. 2006, Abhilash et al. 2008) et plantes aquatiques (Sinha 2002, Ma and Burken 2002, Zhang et al. 2005, Monferran et al. 2008, Ma and Havelka 2009, Miglioranza et al. 2004, Gomez-Hermosillo et al. 2006). Dans ce chapitre, les potentialités de phytoextraction des OCs par la macrophyte, *Phragmites australis*, a été étudiée. Dans cette optique, plusieurs points ont été pris en compte (**Publication 3**) : (i) la bioconcentration passive dans les racines des plantes, (ii) la phytoextraction en conditions transpirantes, (iii) la mise en évidence de la translocation des OCs dans la plante, (iv) l'éventuelle phytovolatilisation des produits. Cette étude permettra de définir l'efficacité de phytoextraction en comparant trois molécules OCs (DCB, TCB, γ -HCH) dont le degré de chloration, la lipophilie, la solubilité et la volatilisation de chaque molécule sont différents. La comparaison des taux d'extraction et de translocation de chaque molécule OC permettra de définir les paramètres physicochimiques expliquant les processus de transfert des OCs dans la plante.

II. Approche expérimentale

1. Conditions d'exposition

Des expériences préliminaires ont corroboré les travaux antérieurs démontrant l'adsorption importante des OCs sur la matière organique du sol (Joo et al. 2008, Lee et al. 2009, Cottin and Merlin 2010 ; **Fig 43a**). Dans nos conditions, cette adsorption est de l'ordre de 70% sur le substrat organique (**Fig 43b**). Ceci peut entraîner un frein au phénomène d'absorption des OCs par les plantes du fait d'une diminution de la concentration en OCs dans la solution et par conséquent une diminution de la part disponible pour la plante.

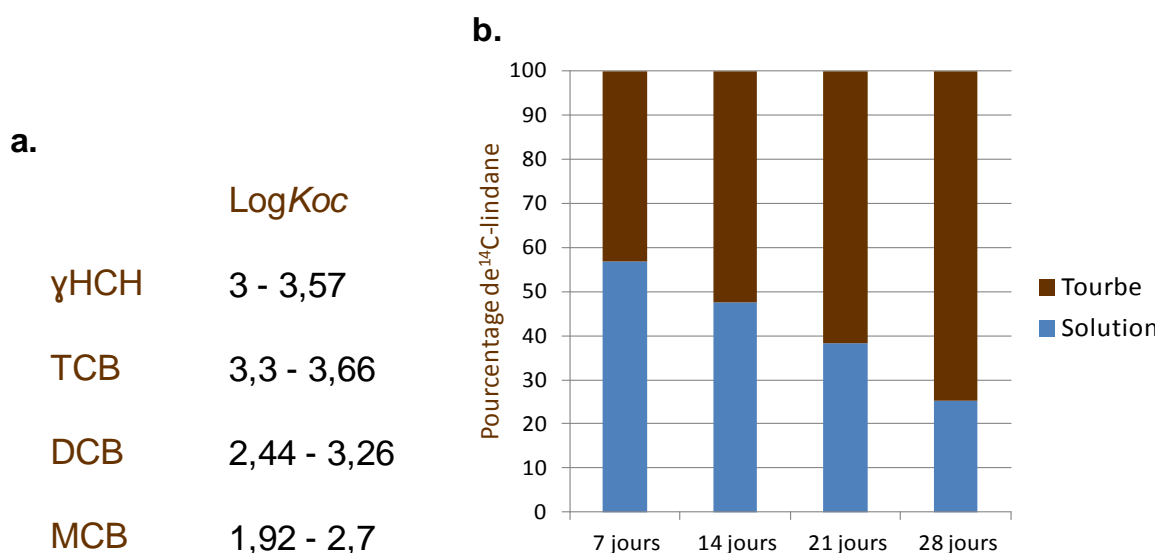


Figure 43 : **a.** Estimation des coefficients de partage avec le carbone organique du sol (logK_{oc}) de chaque OC (Chu and Chan 2000, White 1992, Curl 1984, US EPA, 1996) **b.** Pourcentage de ¹⁴C-lindane retrouvé après 7, 14, 21 et 28 jours de traitement (expérience réalisée avec 2g de tourbe dans 50ml d'eau).

Dans le but d'étudier les mécanismes d'absorption des OCs spécifiquement par les plantes, nous avons choisi de travailler en conditions hydroponiques afin (1) de maintenir la biodisponibilité des OCs dans la solution hydroponique (éviter le phénomène d'adsorption sur la matière organique du sol) et (2) d'étudier les mécanismes d'absorption plus simples entre racines-(eau + OCs). Dans ces conditions hydroponiques, nous nous intéressons majoritairement aux processus d'absorption, d'accumulation et de translocation des OCs au sein des plantes.

2. Mesure de la phytoextraction

Les expériences permettant de mettre en évidence l'absorption des OCs dans la plante ont été réalisées en utilisant des molécules OCs marquées au ^{14}C (**Fig 44**). Les racines et les plantes entières ont été exposées aux concentrations de traitement correspondant aux $\text{NOEC}_{7\text{jours}}$. Après exposition, les plantes ont été disséquées et chaque organe a été broyé en présence d'éthanol afin d'extraire les composés radioactifs. Les extraits sont ensuite dosés par comptage à scintillation liquide. Cette ^{14}C -détection nous permet de quantifier et de localiser les ^{14}C -composés (molécules mères et filles). Ce protocole a permis d'estimer : (1) l'absorption passive des OCs dans les racines, (2) la distribution dans la plante entière en conditions transpirantes et (3) la mise en évidence des mécanismes de translocation.

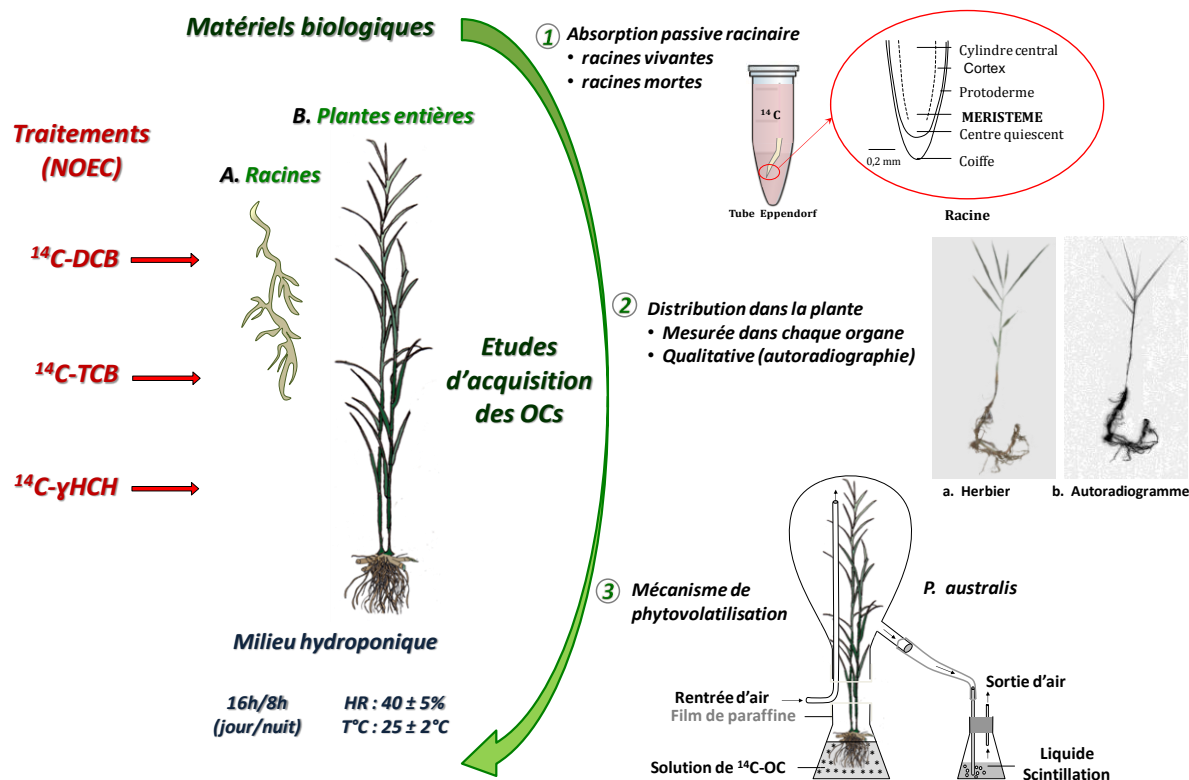


Figure 44 : Schéma expérimental pour la mise en évidence de l'absorption des OCs. Protocoles ① ② ③ : Publication 3. HR : Humidité Relative.

III. Résultats et discussions

1. Absorption racinaire des polluants

Une absorption possible des OCs est mise en évidence par voie passive dans les racines de *P. australis* (**Publication 3** ; résultats similaires avec les racines de *Z. mays*, résultats non montrés). Les résultats obtenus comparent deux types de matériel, mort et vivant et montrent des valeurs de *RCF* (Facteur de Concentration dans les Racines) calculées et mesurées comparables. Le *RCF* est fortement corrélé (z-test ; $p < 0.0001$; $R^2 = 0.956$) à la lipophilie des molécules et augmente avec le $\text{Log}K_{ow}$ (**Fig 45**). Cette corrélation confirme ainsi un processus de pénétration par partition/diffusion pour chacun des polluants OCs dans les zones lipophiles des racines des plantes. Chez *P. australis*, les racines ont une anatomie particulière, avec des tissus présentant une importante subérisation ou lignification de la paroi cellulaire (**Fig 46**) (Paterson et al. 1990, Soukup et al. 2002). Ces tissus particuliers de l'hypoderme et de l'endoderme sont considérés comme des barrières limitant les pertes en oxygène (Armstrong et al. 1988,

Armstrong et al. 2000). Une forte partition des OCs au niveau de ces tissus subérifiés/lignifiés racinaires de *P. australis* peut être alors envisagée. Un tel réseau lipidique au sein des racines risque de favoriser une bioconcentration des OCs dans ces tissus souterrains au détriment d'une translocation des OCs vers les parties aériennes des plantes (Dietz and Schnoor 2001).

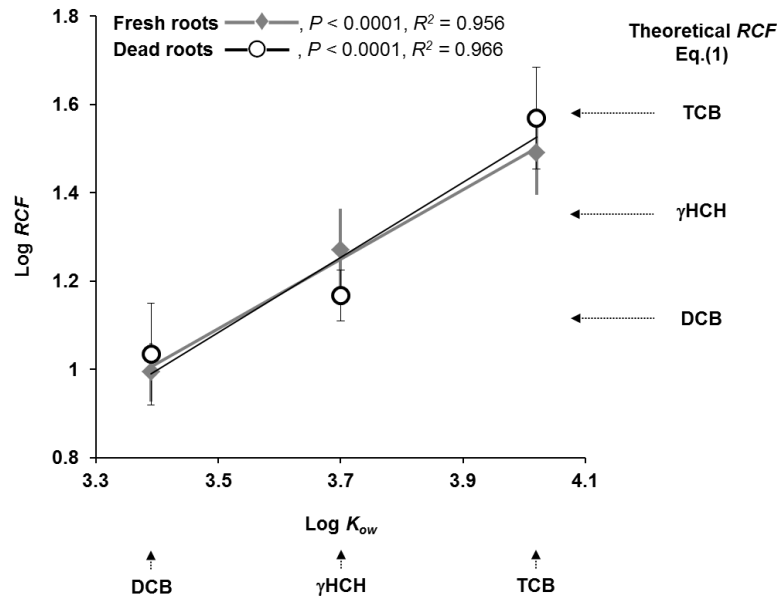


Figure 45 : Corrélation entre les valeurs de RCF et LogKow mesurées dans les racines vivantes et mortes de *P. australis* exposées aux DCB, TCB et γ HCH. $RCF \text{ mesuré} = Cr/Cw$. $RCF \text{ théorique} = 0.82 + 0.03K_{ow}^{0.77}$ (Briggs et al. 1982, Schraa et al. 1986, Spain and Nishino 1987, Haigler et al. 1999, Field and Sierra-Alvarez 2008). Les points représentent la moyenne \pm SE (n = 3).

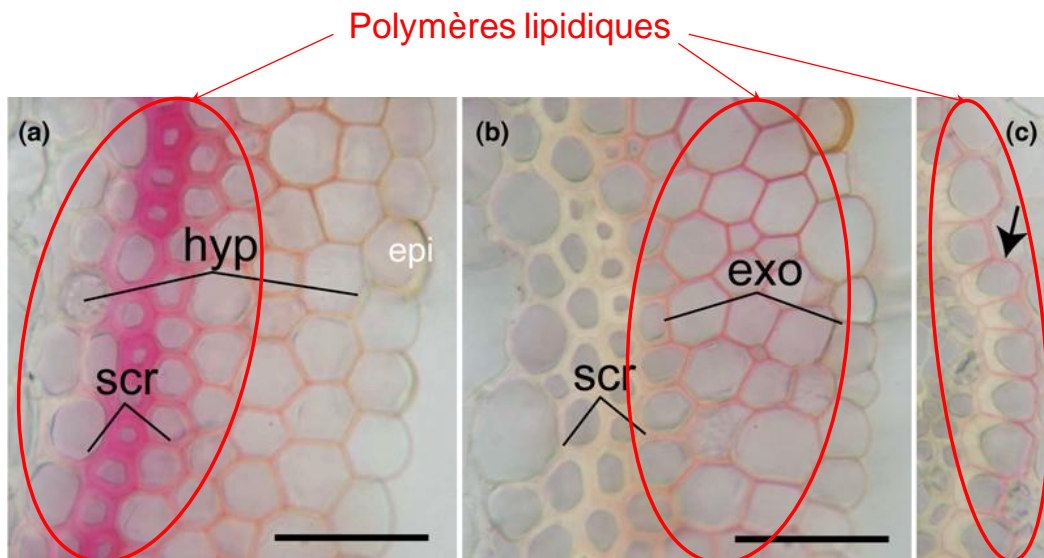


Figure 46 : Comparaison de la structure de l'hypoderme et de l'endoderme des tissus racinaires de *P. australis*. Echelle des barres : 50 μ m. **(a)** coloration au phloroglucinol-HCl détectant la lignine (rose) dans l'hypoderme (hyp) et dans le sclérenchyme (scr); **(b)** exoderme (exo) subérisé coloré au rouge Soudan 7B; **(c)** l'endoderme subérisé coloré au rouge Soudan 7B. (Soukup et al. 2007).

2. Absorption par la plante entière

L'absorption de composés organiques par les plantes est un mécanisme étonnamment efficace pour des composés chimiques modérément hydrophobes (cas de beaucoup d'herbicides de prélevée). C'est le cas des solvants chlorés, des composés chimiques aliphatiques à chaînes courtes, le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène (Schnoor et al. 1995). Dans cette partie, la question posée repose sur l'évaluation de la capacité de *P. australis* à acquérir les composés chlorés étudiés et de visualiser la localisation de ces composés transformés ou non dans chacun des compartiments : racines, rhizomes et feuilles.

Les résultats ont révélé d'une façon générale que l'absorption des OCs dans la plante au court du temps, se faisait avec une distribution dans l'ensemble des organes (**Fig 47 ; Publication 3**). Entre 0 et 7 jours d'exposition, les plantes absorbent jusqu'à $1.3 \pm 0.4\%$ DCB, $5.99 \pm 2\%$ TCB et $13.91 \pm 5.6\%$ γ -HCH de la dose initiale d'exposition. Ces tendances d'absorption des ^{14}C -OCs dans les plantes sont différentes des estimations théoriques calculées à partir du flux transpiratoire (**Fig 47**). Par exemple à 7 jours d'exposition, les concentrations mesurées dans les plantes sont 5,6 et 8 fois plus fortes que celles calculées respectivement pour le DCB et le TCB. Par contre à 28 jours, les ^{14}C -concentrations sont 3,5 et 1,8 fois plus faibles que celles calculées pour le DCB et le TCB. Les données mettent en évidence une perte non négligeable des composés les plus volatiles. Concernant le γ -HCH, la ^{14}C -quantité interne se stabilise après 7 jours d'exposition. Les concentrations mesurées sont largement supérieures (facteurs compris entre 7 et 100) aux concentrations théoriques calculées à partir du flux transpiratoire. Les macrophytes *P. australis* sont capables d'absorber les OCs biodisponibles dans la solution du sol en contact avec les racines.

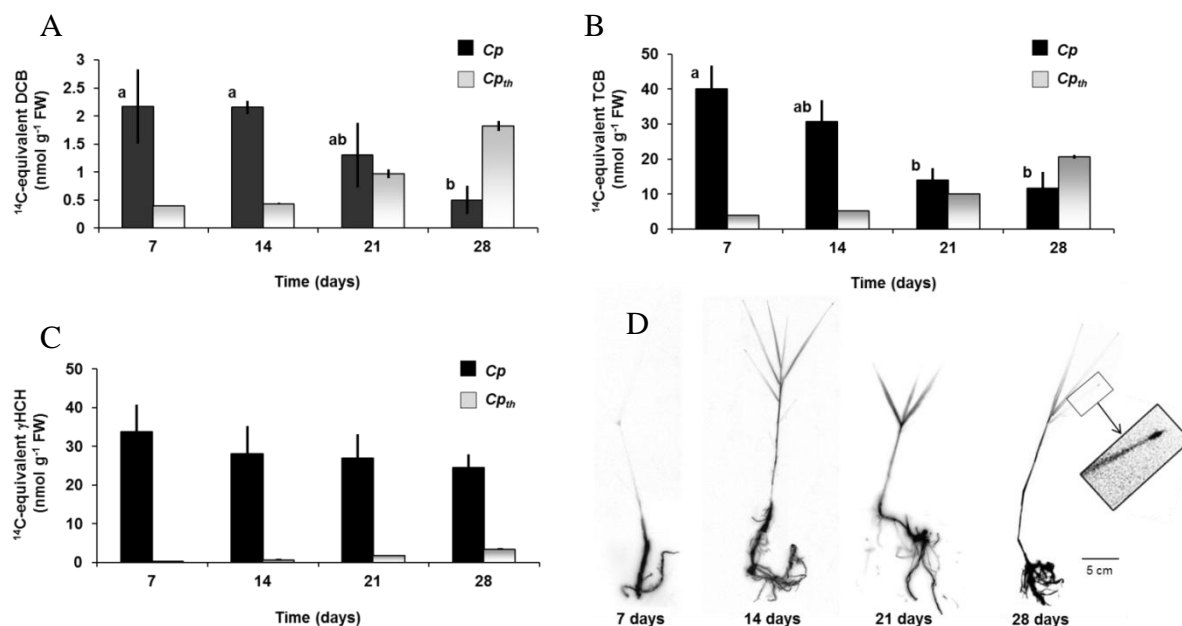


Figure 47 : Distribution des ^{14}C -OCs (^{14}C -DCB (A), ^{14}C -TCB (B) et ^{14}C -HCH (C)) dans les plantes de *P. australis* pendant 28 jours d'exposition.

$C_{p_{th}} = (\text{Tr} \cdot n \cdot S \cdot C_{w_{t_1-t_2}} / M_p) + (\text{Tr} \cdot n \cdot S \cdot C_{w_{t_2-t_3}} / M_p) + \dots$ où $C_{p_{th}}$ est la concentration théorique dans la plante (nmol g⁻¹ FW), Tr le taux de transpiration (ml jour⁻¹ cm⁻²), n l'intervalle de temps d'exposition (jour), S la surface foliaire des plantules (cm²), C_w la concentration moyenne en OC dans la solution hydroponique entre t_n and t_{n+1} (nmol ml⁻¹) et M_p la masse fraîche totale des plantes (g FW).

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ES ($n = 3$). **a, b** représentent les différences significatives $p < 0.05$ (Mann-Whitney).

(D) Autoradiographie représentant la distribution du ^{14}C -HCH dans les plantes *P. australis* au cours du temps d'exposition.

3. Mécanisme de translocation des ^{14}C -OCs dans la plante

La translocation des OCs dans les plantes montrent des corrélations significatives en comparant $C_{\text{Racine}}-C_{\text{Rhizome}}$, $C_{\text{Racine}}-C_{\text{Feuille}}$ pour le DCB (**Fig 48a et b**) et $C_{\text{Racine}}-C_{\text{Rhizome}}$ pour le TCB (**Fig 48c**). De tels résultats ont déjà été reportés ultérieurement pour le TCB (He et al. 1996). Cependant, aucune corrélation significative n'a été mesurée entre les ^{14}C -concentrations internes suite à une exposition au ^{14}C -HCH (**Fig 48e et f**). Il apparaît qu'en fonction des propriétés physicochimiques (cf Introduction § 2 ; Tableau 1 et 3) des OCs testés, le mode de distribution au sein des plantes semble être différent. L'explication du transfert des OCs au sein des plantes peut dépendre de plusieurs paramètres physicochimiques des molécules : le coefficient de partition, la limite de solubilité dans l'eau, la volatilité (Trapp 2004).

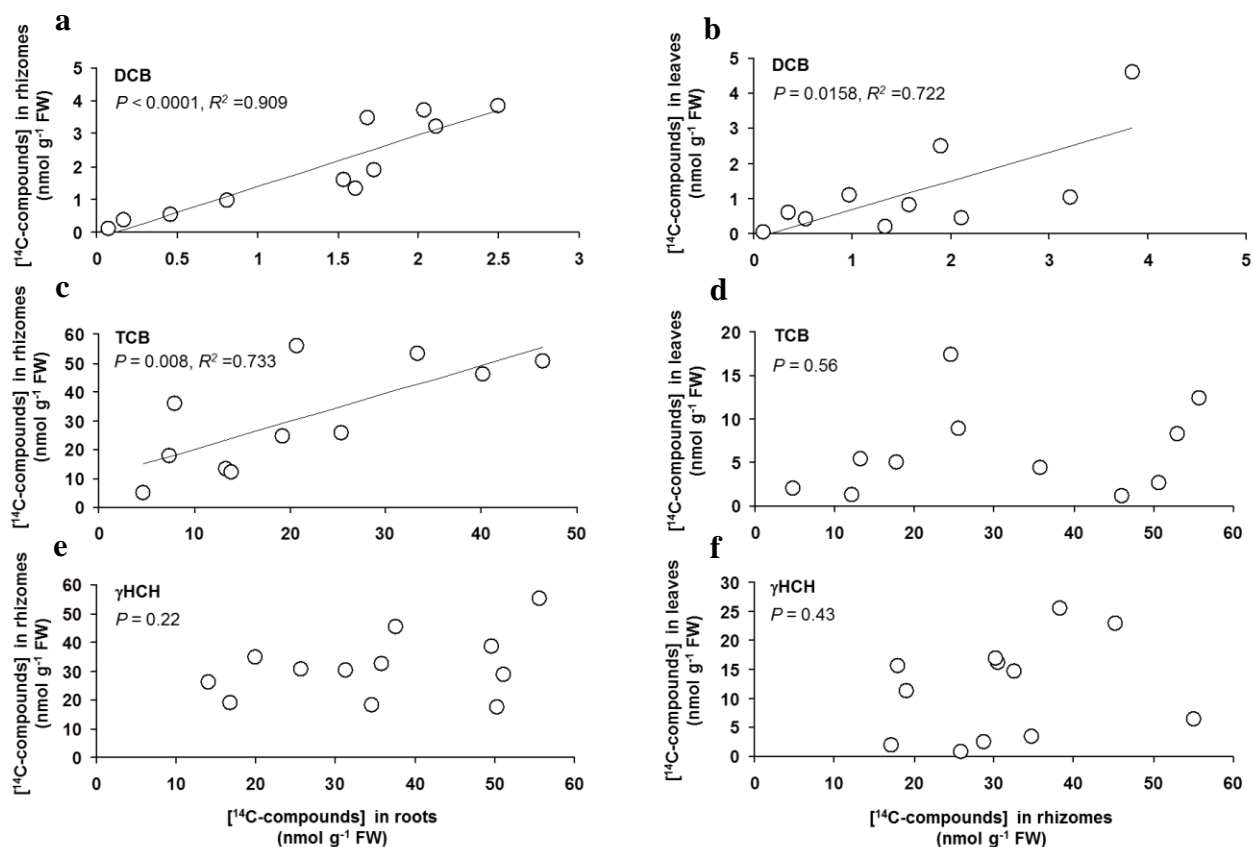


Figure 48 : Corrélations entre les ^{14}C -concentrations mesurées dans les racines, les rhizomes et les feuilles de *P. australis* exposées au ^{14}C -DCB (a,b), ^{14}C -TCB (c,d) et ^{14}C -HCH (e,f). Chaque valeur correspond à la concentration en radioactivité mesurée. Les tests statistiques de corrélation correspondent à un test z de corrélation.

La lipophilie des molécules OCs explique en partie la bioaccumulation des OCs dans les racines mais ne semble pas être le paramètre expliquant la translocation interne des OCs dans les plantes, notamment du rhizome vers les feuilles. Par contre, de bonnes corrélations ont été obtenues en comparant les facteurs de translocation avec les paramètres de solubilité et de volatilité (**Fig 49**). Il apparaît que la translocation interne des OCs augmente avec la solubilité et la volatilité des OCs testés (**Fig 49a**).

Ces résultats semblent démontrer que les OCs sont en partie transférés dans la plante par le flux xylémien dont le moteur est la transpiration foliaire. Ce premier processus de transfert n'explique pas la totalité de l'absorption et du transfert puisque les concentrations en OCs mesurées dans la plante sont supérieures à celles théoriques calculées à partir du flux transpiratoire (**Fig 49**). Un second processus de transfert interne peut alors être envisagé correspondant à une translocation des OCs dans le système de transfert des gaz au sein des tissus. Cette hypothèse est soutenue par les descriptions anatomiques et le fonctionnement physiologique des macrophytes (**Fig 50** ;

(Brix 1994, Colmer 2003, Vogel 2004), par les corrélations obtenues précédemment (**Fig 49**) et par des travaux précédents démontrant la possibilité d'un tel transfert (Nietch et al. 1999). Par ailleurs, il se peut que l'absorption/transfert de ^{14}C -composés que nous avons mesuré soit lié à un processus de métabolisation libérant des métabolites plus volatiles que les molécules mères. Par exemple, le HCH peut être métabolisé en TCB et chlorophénol (Balba and Saha 1974) dans les tissus végétaux, libérant ainsi des molécules chlorées plus volatiles et pouvant expliquer la perte de radioactivité par phytovolatilisation (**Fig 49B**). Ces métabolites sont produits en phase I de détoxification mais d'autres métabolites issus de la phase II pourraient expliquer l'accumulation observée des OCs dans les racines voire le rhizome. Ces métabolites correspondent dans la majorité des cas à des conjugués (Pflugmacher et al. 1999, Loutre et al. 2003).

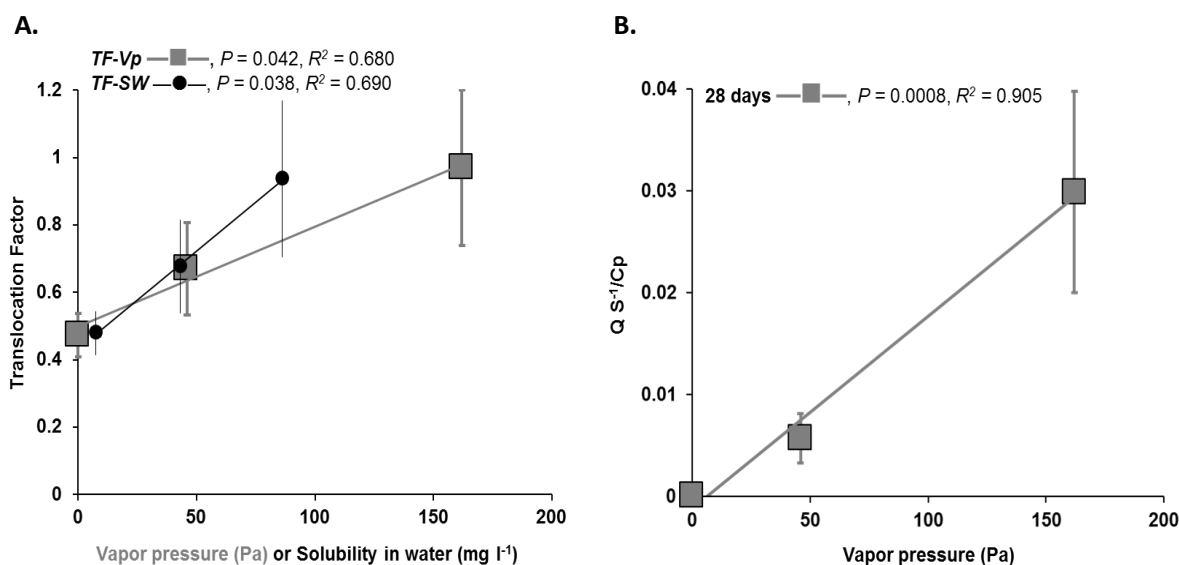


Figure 49 : Corrélation des facteurs de translocation **(A)** et des facteurs de phytovolatilisation **(B)** en fonction de la volatilisation et de la solubilité des OCs testés.

Translocation Factor (TF) = CL/Cr ; où CL est la ^{14}C -concentration dans les feuilles ($nmol\ g^{-1}\ FW$) et Cr est la ^{14}C -concentration dans les racines ($nmol\ g^{-1}\ FW$) (Rocheleau et al. 2008).

Pvol = $Q\ S^{-1}/Cp$; où Q est la quantité de ^{14}C -composés volatilisés à partir des surfaces foliaires ($nmol$), S la surface foliaire (cm^2), Cp la ^{14}C -concentration dans les plantes ($nmol\ g^{-1}\ FW$).

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ES ($n=3$). Le test de corrélation est un test-z.

4. Mise en évidence du mécanisme de phytovolatilisation

La **Figure 47** met en évidence une perte de radioactivité à partir des plantes au cours du temps. Des études précédentes ont démontré cette capacité qu'ont certaines plantes à volatiliser les POPs en fonction de différents critères tels que la concentration du milieu, la surface foliaire, la structure des molécules etc... (Newman and Reynolds 2004, Yu and Gu 2006, Abhilash and Singh 2010, Mothes et al. 2010).

La fraction de ^{14}C -volatilisée au niveau des feuilles de *P. australis* a pu être mesurée grâce à des pièges à solvants pouvant solubiliser les molécules volatiles (Fig 1 de la **Publication 3**). Le niveau de phytovolatilisation le plus important a été obtenu avec le DCB conduisant à une perte totale de 0.09%. Le TCB et le HCH conduisent à une phytovolatilisation de ^{14}C -composés de l'ordre respectivement de 0.02% et 0.03%. Par ailleurs, la phytovolatilisation des OCs est directement corrélée ($p= 0.0008$) à leur volatilité (**Fig 49B**). La phytovolatilisation du HCH pourrait être liée à sa métabolisation produisant des métabolites plus volatils tels que des chlorobenzènes (Balba and Saha

1974). Des études précédentes sur une graminée *Holcus lanatus* exposée au DCB et au TCB, ont démontré une volatilisation possible *via* les parties aériennes (Wilson and Maharg, 2003). Ces mêmes études ont révélé des rejets en $^{14}\text{CO}_2$ dans les deux cas, représentant une possible minéralisation des OCs d'une valeur moyenne $<1\%$. Il est alors cohérent de penser que le mécanisme de phytovolatilisation et de minéralisation soit possible dans les macrophytes du genre *Phragmites*.

De plus, les plantes aquatiques telles que les macrophytes, possèdent un système d'air circulant allant des racines *jusqu'aux* parties supérieures de la plante, pour finir dans l'atmosphère (**Fig 50**). Il n'est donc pas exclu que les polluants volatils tels que les benzènes chlorés puissent dans ce cas, s'infiltrer dans ces courants gazeux à travers les tissus aérochymateux de la plante, conduisant à une phytovolatilisation à partir des tiges vertes de *P. australis*.

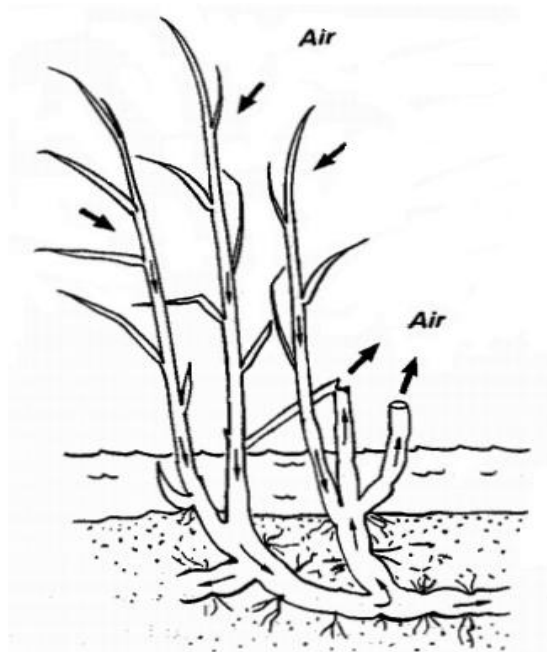


Figure 50 : Circulation gazeuse chez le roseau commun (*P. australis*). Le flux d'air rentre à travers les gaines des feuilles au niveau des tiges vertes, contre un gradient de pression qui induit alors, de l'humidité par pressurisation. L'air passe ensuite vers le bas dans le rhizome et remonte vers les parties mortes ou cassées retournant ainsi dans l'atmosphère (Brix 1994).

IV. Conclusion

Les plantes *P. australis* sont capables d'extraire les OCs des matrices contaminées dès lors que les OCs sont solubilisés (et biodisponibles) dans l'eau à proximité des racines. L'absorption racinaire conduit à une accumulation des OCs dans les racines végétales puis à un transfert plus faible des OCs et de leurs métabolites au sein de la plante jusqu'aux feuilles (**Tableau 2 Publication 3** et **Fig 47D**). La localisation de la radioactivité montre que les molécules peuvent s'accumuler en bordure des feuilles (zone majoritaire de transpiration).

Tous les résultats obtenus à partir de plantes entières, indiquent que: (1) le DCB et le TCB sont tout d'abord bioaccumulés dans les plantes et semblent être ensuite en partie phytovolatilisés et (2) que le HCH est bioaccumulé dans les plantes et semble être métabolisé.

Cette étude (**Publication 3**), aura permis de décrire et de comprendre les mécanismes de translocation des OCs dans la plante. Les principaux résultats obtenus sont :

- Les xénobiotiques avec un volume molaire n'excédant pas les 300 cm³ mol⁻¹ et avec un logKow ≥ 3 sont susceptibles d'avoir un taux de translocation faible, dû à leur forte rétention dans les parties lipophiles des tissus de la plante (Satchivi et al. 2006). Ceci est confirmé par l'évaluation des facteurs de translocation (TF des racines aux feuilles) qui sont en-dessous de 1, indiquant que les OCs ont bien été prélevés par les racines mais très modérément transportés dans les tiges.

- Contrairement à ce que nous pouvions penser, l'absorption et la translocation du DCB, du TCB et du γ HCH dans la plante ne sont pas simplement corrélés avec le coefficient de partition (absence de corrélation entre les différents facteurs évalués (PCF, RCF, LCF) et le LogKow). En concordance avec d'autres études, une relation non linéaire est obtenue entre le facteur de translocation dans le flux transpiratoire (TSCF) (correspondant au transfert des molécules dans la sève brute) et les valeurs de logKow des OCs étudiés (Sicbaldi et al. 1997, Dettenmaier et al. 2009).

- D'après les résultats d'études antérieures (Paterson et al. 1990, Collins et al. 2006), il semblerait que beaucoup de composés organiques de solubilité moyenne dans l'eau, soient susceptibles d'être transportées dans les tiges *via* le flux transpiratoire. Dans notre cas, de fortes corrélations existent entre l'absorption du DCB, du TCB et du HCH (PCF, RCF et LCF) et leur solubilité dans l'eau.

- Néanmoins un autre facteur peut être pris en compte, en complément de ces résultats ; la pression de vapeur (Vp) des polluants organiques (Paterson et al. 1990). Effectivement dans notre étude, de bonnes corrélations TF-Vp (facteur de translocation en fonction de la pression de vapeur) sont observées à 28 jours d'expérimentation. Plus la volatilité des OCs est élevée, plus les OCs sont susceptibles d'être transférés dans la plante. L'hypothèse d'un tel transfert correspondrait à une circulation gazeuse des OCs, à travers les tissus aërenchymateux de la plante (Pardue 2002, Ma and Burken 2003).

- Par ailleurs, la phytovolatilisation des OCs a été mesurée à partir des feuilles et des tiges vertes de *P. australis*. Le facteur de phytovolatilisation (Pvol, rapport entre la quantité volatilisée au niveau des parties foliaires et la concentration retrouvée dans les plantes) est positivement corrélé à la volatilité des OCs.

Publication 3

En préparation pour Journal of Hazardous Materials

A comparative study of the uptake and translocation of organochlorines by *Phragmites australis*

Angélique San Miguel, Patrick Ravanel, Muriel Raveton^{*}

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53,
38041 Grenoble Cedex 09, France.

*Author for correspondence:

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53,
38041 Grenoble Cedex 09, France. E-mail: muriel.raveton@ujf-grenoble.fr

Abstract

Organochlorines (OCs) are persistent chemicals found in various environmental compartments. The differences in the uptake of 1,4-dichlorobenzene (DCB), 1,2,4-trichlorobenzene (TCB) and γ -hexachlorocyclohexane (γ HCH) ^{14}C -labeled by *Phragmites australis* were investigated under hydroponic conditions. Sorption and uptake are governed by the physicochemical properties of OCs. The first step in sorption appears to be correlated with the hydrophobicity of the compounds, since linear correlations were obtained between RCF and $\text{Log}K_{ow}$. Uptake and translocation were seen to be more complex, with a loss of the simple relationship between uptake and $\text{Log}K_{ow}$. Linear correlations between the bioconcentration (PCF , RCF , LCF) and translocation (TF , $TSCF$) factors and the OC parameters have been shown, an example being the observation that translocation from roots to shoots increases with solubility (*via* the xylem transpiration water flow) and volatility (*via* vapor fluxes inside the aerenchymatous system) of the OCs. After 7 days of exposure, significant measurements of plant uptake were made, with DCB, TCB and γ HCH content values reaching 1.3%, 5.9% and 13.9%, respectively. Following this, ^{14}C -phytovolatilization in *P. australis* leaves was measured. This phytovolatilization was positively correlated to the volatility of the compounds; the most volatile OCs being more likely to be phytovolatilized from foliar surfaces. Thus, OC uptake appears to proceed at a rate that depends mostly on OC hydrophobicity, solubility and volatility.

Keywords: Organochlorines, *Phragmites australis*, Uptake, Translocation

1 Introduction

Until the 1990s, Lindane (γ -hexachlorocyclohexane, γ HCH) was one of the most extensively used organochlorine (OC) insecticides. It was used to control a wide range of agricultural, horticultural and public health pests [1]. The application of γ HCH has resulted in environmental contamination of global dimensions and its high stability has generated serious problems in a variety of circumstances around the world [2]. The most contaminated areas to be found tend to be former industrial sites, waste disposal sites and, finally, agricultural soils [3, 4]. Moreover, γ HCH residues at many sites have percolated through the soil and contaminated the groundwater, an example being contamination levels of up to $730 \mu\text{g l}^{-1}$ from an industrial point source in Germany [5]. The presence of environmental residues of HCH isomers has now been reported for many countries and the existence of contamination in water and in sediments has been established [6]. Environmental levels of Σ HCH isomer contamination vary, ranging from 0.41 to 2.8 ng l^{-1} in surface waters, for example [7]. Sediment contamination levels also range from 1.95 to 11.05 ng g^{-1} [8], and can be as high as 396 ng g^{-1} near industrial areas [5].

The distribution of γ HCH in the environment has led to contamination of the anaerobic and aerobic compartments in which microbial biodegradation occurs [6]. Several studies have reported the production of chlorobenzenes (CBs) by microorganisms during the anaerobic degradation of γ HCH and, in a minority of cases, during the aerobic pathway [5, 6]. Under anaerobic conditions, the major γ HCH reductive dechlorination pathway produces an end product: monochlorobenzene (MCB). Under aerobic conditions, by a series of dehalogenations, the most frequently observed pathways produce trichlorobenzene (TCB) and dichlorobenzene (DCB) as stable end products that may accumulate in the natural environment [9]. These CB compounds are relatively volatile and chemically stable, with high *n*-octanol-water partition coefficients, and as a consequence, bioaccumulation may be expected in organisms [10] (Table 1). Concentrations of CBs in the environment vary, ranging from 0.07 to 34.79 ng l^{-1} in water from industrial catchments, for example [11] or from 89.9 to $6,638 \text{ ng l}^{-1}$ for Chinese urban drainage [12] and from 0.4 to $5.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ in sediments [10].

Phytoremediation is a cost-effective and environmentally friendly technology for the decontamination of soils, and could potentially be applied to large-scale areas [13, 14]. The uptake of γ HCH and CB (the phytoextraction process) has been reported in different studies, both by crop plants [4, 15-18] and wetland plants [17, 19-22]. Wetland plants such as

Phragmites communis and *Typha angustifolia* have shown potential for the phytoremediation of chlorinated contaminants [22].

Phytoremediation is a minimally invasive technology that cleans waters and sediments that are contaminated with pollutants. Macrophytes are potentially suitable for phytoremediation of organic pollutants such as organochlorines, although their effectiveness for phytoextraction has yet to be tested. A lack of understanding of the fate of pollutants that display different degrees of lipophilicity and volatilization in a water-plant-atmosphere system hampers efforts to establish effective phytoremediation techniques. The objective of this study has been to analyze the distribution of pollutants belonging to the same class of chemicals (γ HCH and its DCB and TCB metabolites) in a contaminated water-*Phragmites australis*-atmosphere system. The specific goals were (i) to measure the uptake and translocation of the three selected OCs in *P. australis*, (ii) to measure the phytovolatilization potential and (iii) to compare the experimental results with plant uptake models in order to understand the mechanisms involved in their distribution.

2 Materials and methods

2.1. Plant cultivation

Phragmites australis plants were purchased from La ferme de Chosal (Annecy, France). Plants were washed to eliminate soil and were then grown hydroponically (Hoagland nutritive solution renewed every week). After at least 3 weeks of cultivation under controlled conditions [16:8h light:dark; $70 \pm 5\%$ Relative Humidity (RH); $25 \pm 2^\circ\text{C}$; $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Photosynthetically Active Radiation (PAR)], plants showing healthy growth were selected for further experimentation.

2.2. Treatment with organochlorine contaminants

The 99% pure organochlorines (OCs) used for the plant-uptake studies [γ -hexachlorocyclohexane (γ HCH), 1,4-dichlorobenzene (DCB) and 1,2,4-trichlorobenzene (TCB)] were obtained from Sigma-Aldrich. The physicochemical properties of the selected OCs are listed in Table 1. The ^{14}C -OCs were uniformly labeled on the aromatic ring. γ HCH (894 MBq mmol $^{-1}$) and TCB (825 MBq mmol $^{-1}$) were purchased from the Institute of Izotopes (Hungary) and DCB (185 MBq mmol $^{-1}$) was purchased from Sigma-Aldrich. All plant exposures were performed in hydroponic solutions that contained single-exposure OCs. Previous studies have shown that OC uptake increases linearly with an increase in OC

concentration [23-26]. To be able to compare OC distribution in plants, the exposure conditions were selected so that *P. australis* remained in the same physiological state. The OC concentrations used for plant-uptake experiments were the No-Observed-Effect Concentrations (NOECs) for *P. australis* that had been established previously by Faure et al. [27] (Table 1).

2.3. Bioconcentration with fresh and dead roots

Fresh roots (1 cm, 10 mg) of *P. australis* were carefully collected and put into ^{14}C -OC solutions (1.5 ml, NOEC, 2,800 Bq ml⁻¹) for different exposure times ranging from 0 to 96 hours. Dead roots were obtained after collection using a freezing-defrosting cycle (twice). They were rapidly immersed in ^{14}C -OC solution for 24 hours' exposure. After each exposure, the roots were collected, washed, crushed in the presence of ethanol and poured into the scintillation liquid. The radioactivity of the crude root extracts and the hydroponic solutions was measured by scintillation counting (1414 Winspectral, Wallac). The measured bioconcentration factors (Root Concentration Factor, $RCF = Cr/Cw$) were calculated using experimental values for root ^{14}C concentration (Cr , nmol g⁻¹) and nutrient solution ^{14}C concentration (Cw , nmol ml⁻¹). These experimental RCF values were compared to the linear RCF model, for which a fair approximation was expected for non-ionic, non-metabolized and hydrophobic organic chemicals ($1 < \text{Log}K_{ow} < 6$) [28]:

$$RCF = 0.82 + 0.03K_{ow}^{0.77} \quad (1)$$

2.4. Plant uptake

Plants were exposed to ^{14}C -OCs by immersing roots in solutions containing contaminants (150 ml, NOEC (Table 1), 120 Bq ml⁻¹) for 7, 14, 21 and 28 days, under controlled conditions (16:8h light:dark; 40 ± 5% RH; 25 ± 2°C; 250 μE m⁻² s⁻¹ PAR). The plants and ^{14}C -OC solutions were held in a glass cylinder that was closed with plastic paraffin film, through which the plant shoots extended into the air space (Fig. 1). This design prevented the direct evaporation of water from the nutrient solution into the outside air. Thus, the mass of water that was transpired through the plant shoots could be determined accurately by measuring the cumulated weight losses of the plant-solution systems. The weight of each pot, containing one plant, was measured every day. This measurement was compared to the weight of a pot without a plant, and the water loss that corresponded to plant transpiration was calculated. The transpiration rate (Tr) was evaluated as water loss per leaf surface area unit per day (ml

$\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$). After each exposure period, the plants were collected, rinsed with OC solutions (non-radioactive OCs at their limit of solubilization in water) and sectioned into roots, rhizomes and shoots. Each organ was weighed (FW), put in liquid nitrogen and rapidly crushed in the presence of ethanol, as detailed in the analytical procedures below. Each measurement was repeated 3 times. Under the same conditions, vials that contained only the ^{14}C -OCs solutions were monitored during the experimental period, in order to measure the loss by volatilization. The OC uptake was calculated using experimental values of plant ^{14}C concentration (C_p , $\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$).

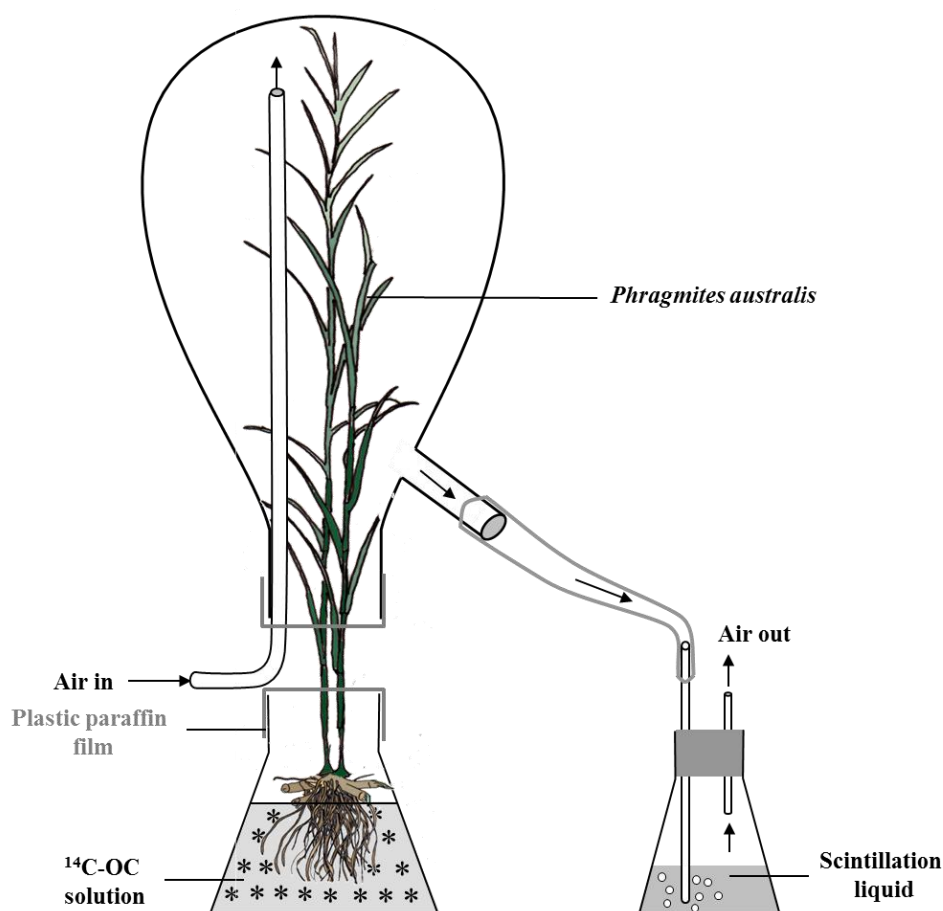


Figure 1 : A schematic diagram of the test chamber system used to measure OC distribution in the water-plant-atmosphere system

The OC uptake in the whole plant ($\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$) was estimated using a model based on the transpiration rate (Tr) and the water concentration (C_w), as a function of exposure time [29]:

$$C_{p_{th}} = (Tr \cdot n \cdot S \cdot C_{w_{t1-t2}} / M_p) + (Tr \cdot n \cdot S \cdot C_{w_{t2-t3}} / M_p) + \dots \quad (2)$$

where $C_{p_{th}}$ is the theoretical OC concentration of the plant ($\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$), Tr the transpiration rate ($\text{ml cm}^{-2} \text{d}^{-1}$), n the exposure interval (days), S the foliar surface area of shoots (cm^2), C_w

the mean of OC concentration in the nutrient solution, between t_n and t_{n+1} (nmol ml⁻¹), and M_p the whole plant fresh weight (g FW).

The Plant Concentration Factor (*PCF*) is defined as the ratio of a pollutant in a plant to that in an aqueous solution, at a thermodynamic equilibrium of the chemical entering and being released from the plant. The apparent PCF can be calculated as followed:

$$PCF = C_p/C_w \quad (3)$$

where C_p is the measured ¹⁴C concentration in the whole plant (nmol g⁻¹ FW) and C_w the final ¹⁴C concentration in the nutrient solution (nmol ml⁻¹).

Root Concentration Factor ($RCF = C_r/C_w$) and Leaf Concentration Factor ($LCF = CL/C_w$, where CL is the ¹⁴C concentration (nmol g⁻¹ FW) in leaves) values were used to evaluate the rates of bioaccumulation, as the ratio of the concentrations in plant tissues to the concentrations in nutrient solutions.

In order to describe the parameters of the translocation of OCs inside plant tissues, different factors were used:

(a) The Transpiration Stream Concentration Factor (*TSCF*). Ideally, the *TSCF* represents the ratio of the concentrations in the xylem sap and in the external solution, and it can be determined experimentally as follows [30, 31]:

$$TSCF = \frac{M_L}{V_t \times \overline{C_w}} \quad (4)$$

where M_L is the ¹⁴C mass transferred into the leaves (nmol), V_t is the transpired volume of water (ml), and $\overline{C_w}$ is the mean of the t_n to t_{n+1} concentration in the nutrient solution (nmol ml⁻¹).

The theoretical *TSCF* values for neutral chemicals were calculated using the following formula [30]:

$$TSCF = 0.784 \exp(-(LogK_{ow}-1.78)^2/2.44) \quad (5)$$

(b) The Translocation Factor (*TF*) is the ratio of the concentrations of the chemical in different organs [32]:

$$TF = CL/C_r \quad (6)$$

where CL is the ¹⁴C concentration in leaves (nmol g⁻¹ FW) and C_r is the ¹⁴C concentration in roots (nmol g⁻¹ FW).

Phytovolatilization was detected using an airflow system (Fig. 1). Leaves and shoots were introduced into a glass bell that was sealed at the base with a plastic paraffin film. An airflow

was applied twice daily, for 30 minutes. At the system output, the flow of air passed through a glass flask containing a scintillation liquid that acted as a trap for ^{14}C -volatile organic compounds. The scintillation liquid was counted each day. At the end of the experiments, each of the containers and paraffin plugs was washed for ^{14}C -counting.

The Phytovolatilization Factor (*PvolF*) represents the experimental ratio between the quantity of ^{14}C that was volatilized from the foliar surfaces and the ^{14}C concentration in the plant:

$$PvolF = Q \cdot S^{-1} / Cp \quad (7)$$

where Q is the measured quantity of phytovolatilized ^{14}C (nmol); S is the foliar surface area (cm^2) and Cp is the measured ^{14}C concentration in the plant ($\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$).

2.5. Analyses of ^{14}C -organochlorine uptake

Plant organs exposed to ^{14}C -OCs were put into liquid nitrogen and rapidly crushed in the presence of ethanol and submitted to three successive ethanol extractions. The alcoholic mixtures were centrifuged at 10,000 g for 10 minutes. The residual powders were shown to be deprived of radioactivity. The quantities of ^{14}C compounds in the ethanolic extracts were measured by scintillation counting (1414 Winspectral, Wallac). During this procedure, losses of $30 \pm 10\%$ ^{14}C were measured for DCBs and TCBs, due to the volatility of these compounds (Table 1), while only a $10 \pm 2\%$ ^{14}C loss was detected for γHCH .

For each ^{14}C -OC exposure time period, one plant was chosen to undergo an autoradiography. The localization of radioactivity in the whole plant was thus revealed using a Cyclone “Storage Phosphor System” (Perkin Elmer®).

2.6. Statistical analyses

The results were processed using XLSTAT 2007.5 software. The uptake kinetics were first analyzed statistically using the Kruskal-Wallis test. Mann-Whitney tests ($n = 5$, non-parametric) were fitted in order to estimate the differences in plant ^{14}C uptake for two exposure times.

The relationships between the different uptake factor values were determined using a z-test for independent correlation coefficients. The p -value in the correlation model was set at a 95% confidence level ($p\text{-value} < 0.05$). The R^2 -value of the correlation model indicates the proportion of the variance that is explained by the model.

3 Results and discussion

3.1 Removal of OCs by *P. australis* roots

Some reports have suggested that roots collected from plants and then immersed in a nutrient solution containing pollutants constitute appropriate systems for the study of the passive partition/diffusion processes involved in organic pollutant removal [26, 33-35]. Fresh and dead roots of *P. australis* that had been exposed to ^{14}C -DCB, ^{14}C -TCB and ^{14}C - γHCH were shown to be able to absorb these OCs. For all OCs, the uptake coefficient (RCF , Cr/C_w) increased with time up to 10 ± 6 hours of exposure, with the RCF remaining stable thereafter. The RCF values that were calculated when a state of equilibrium was reached were of the same order of magnitude as those obtained in previous studies [26, 36]. The RCF was strongly correlated ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.956$) with the hydrophobicity of the compounds; RCF increased with $\text{Log}K_{ow}$ (Fig. 2).

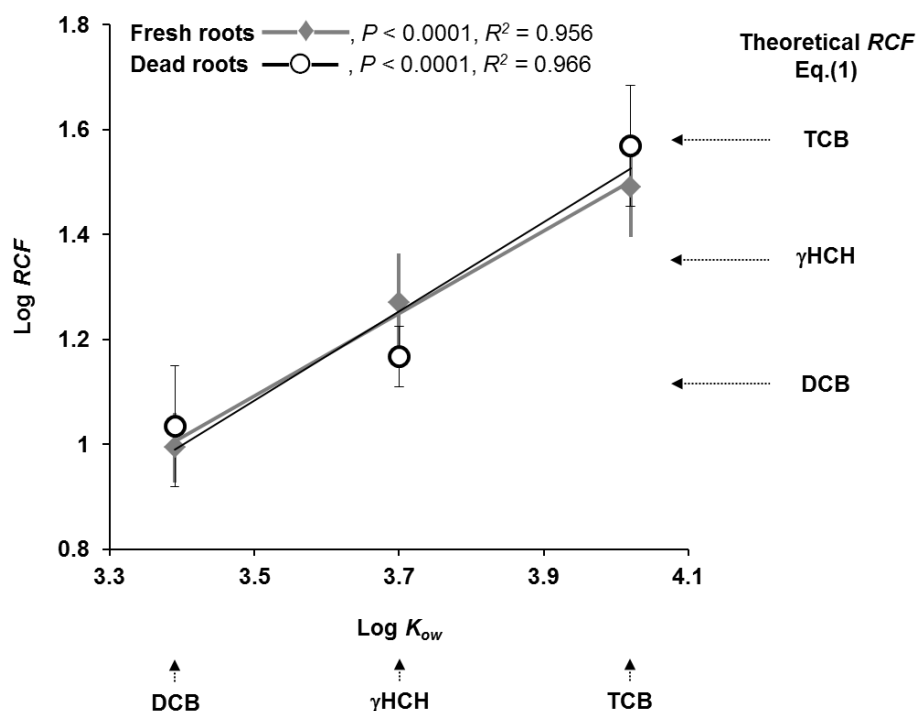


Figure 2. RCF values of DCB, TCB and γHCH as a function of $\text{Log}K_{ow}$ (A) and vapor pressure (B) in fresh and dead roots of *P. australis*.

Measured RCF (Cr/C_w) values are the mean \pm SE ($n = 3$). Theoretical RCF values were calculated using Eq. (1).

Similar empirical correlations have also been observed for other contaminants (with the same level of hydrophobicity) in plant roots [30, 36]. Different processes may be involved in the uptake of organic pollutants by roots, i.e., (i) absorption by passive partition and diffusion, which is directly related to the lipid contents and the hydrophobicity of pollutants [24, 34];

and (ii) adsorption onto the root surface, which limits translocation within plant tissues [24]. If the $\text{Log}K_{ow}$ values of DCB, γHCH and TCB (3.39, 3.7, 4.02) and the calculated RCF value [Eq. (1)] are examined, the measured and calculated RCF values are similar (Fig. 2). Thus, DCB, γHCH and TCB essentially penetrate the roots by the passive partition/diffusion process with pollutants being retained by the lipids in the root tissues. It may be considered that there is a strong sorption or a boundary in the *P. australis* root external layer, most notably in the sclerenchymatous ring (hypodermis) and in the Casaprian bands in the exodermis: tissues in which cell walls are highly lignified [37, 38]. The respective RCF values obtained with dead roots were similar to those obtained with fresh roots (Fig. 2). However, in the case of γHCH , a significant variance was observed (Man-Whitney, $p = 0.025$), showing a small decrease in RCF (factor 1.3) in dead roots. Plants have been shown to be able to degrade γHCH [39], which might explain this increase in bioaccumulation in fresh roots.

3.2 OC uptake in *P. australis* plants

3.2.1 OC distribution in plants

CONFIDENTIEL

Table 1. Physicochemical properties of organochlorines

MW = molecular weight; $\text{Log}K_{ow}$ = *n*-octanol/water partition coefficient; SW = Solubility in water; MV = Molar Volume; V_p = Vapor Pressure; NOEC = No Observed Effect Concentration

Contaminants	Abbrev.	MW	SW (mg l ⁻¹)	$\text{Log}K_{ow}$	MV (cm ³ mol ⁻¹)	V_p (Pa)	NOEC (μM) ^e
1,4-dichlorobenzene	DCB	147	80	3.39 ^a	137.8 ^b	162 ^a	7
1,2,4-trichlorobenzene	TCB	181.5	40	4.02 ^a	158.7 ^b	46 ^b	50
Hexachlorocyclohexane	γHCH	291	7	3.70 ^d	243.5 ^d	1.25.10 ^{-3d}	3

^a [17]

^b [54]

^c [55]

^d [56]

^e[27]

CONFIDENTIEL

The uptake of OCs by *P. australis* plants is a potentially significant fate pathway, with the existence of a time-graduated ¹⁴C distribution in whole plant organs shown by the autoradiography of plants exposed to ¹⁴C-OCs (Fig. 3).

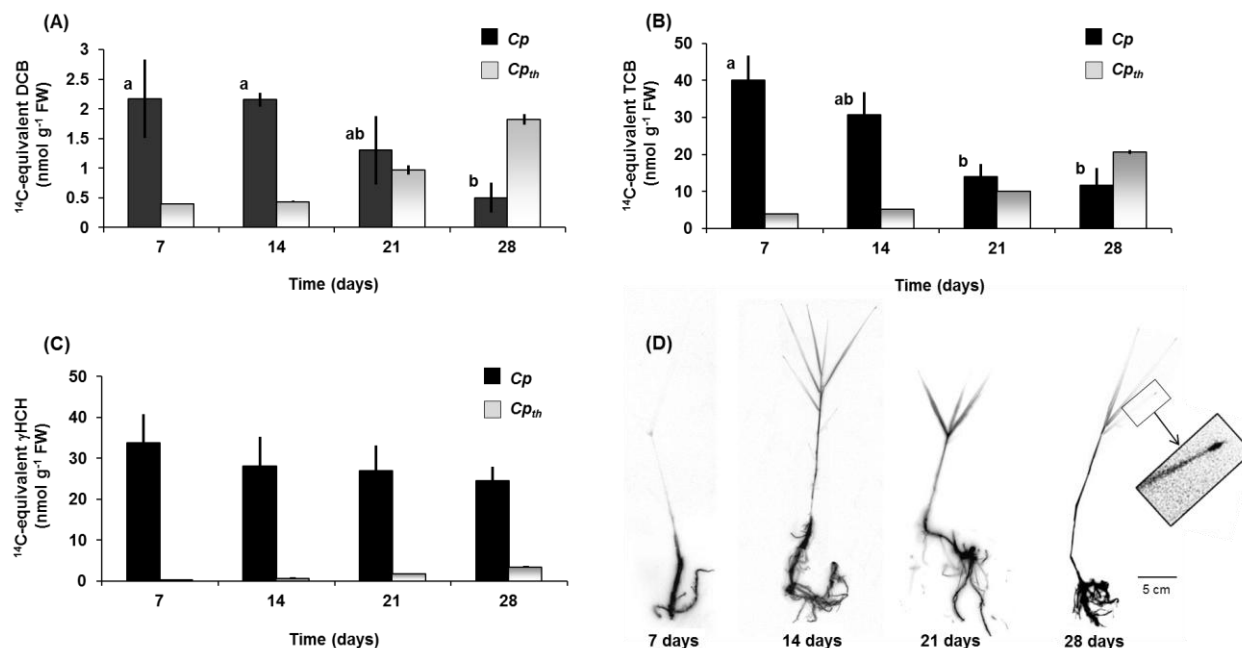


Fig. 3. ^{14}C concentrations in *P. australis* plants exposed to ^{14}C -DCB (A), ^{14}C -TCB (B) and ^{14}C - γ HCH (C,D) for 28 days.

Each point is the average of three replicates and standard error bars, mean \pm SE.

C_p , measured ^{14}C concentration in total plant (nmol g $^{-1}$ FW); $C_{p_{th}}$, theoretical OC concentration in the plant (nmol g $^{-1}$ FW) calculated with Eq. (2).

D. Autoradiography showing the increase in the radioactivity in the plant over time, during exposure to ^{14}C - γ HCH.

After 7 days of exposure, the plants had absorbed $1.3 \pm 0.4\%$, $5.99 \pm 2\%$ and $13.91 \pm 5.6\%$ of DCB, TCB and γ HCH, respectively (Table S1). Over the 7-day exposure period, the amount of ^{14}C inside the plants evolved differently. There was a decrease in ^{14}C content after 7-day exposure to DCB and TCB, while there was a slight increase in ^{14}C content in plants exposed to γ HCH (absorption at 28 days for DCB, TCB and γ HCH was $0.25 \pm 0.1\%$, $1.14 \pm 0.19\%$ and $15.6 \pm 0.54\%$, respectively). The same levels of OC removal have been measured using *Lolium* sp, *Holcus* sp, *Salix* sp, *Scirpus* sp plants [20, 40, 42]. Using our uptake model, based on the transpiration rate and the solution concentration [Eq. (2)], the ^{14}C concentrations measured in plants differed greatly from the theoretical $C_{p_{th}}$ concentrations (Fig. 3). At 7 days of exposure, ^{14}C concentrations were 5.6 and 8 times higher than the $C_{p_{th}}$ values calculated for DCB and TCB, respectively. Inversely, at 28 days, ^{14}C concentrations were 3.5 and 1.8 times lower than the $C_{p_{th}}$ calculated for DCB and TCB. Nevertheless, the PCF ratios (Eq (3), Table S2) for DCB and TCB increased with exposure time and the RCF and LCF ratios showed the same shape of curve for accumulation with time. This ^{14}C concentration decrease in plants might be linked to the strong decrease in the ^{14}C concentration in solution, due to

volatility of these pollutants (Table S1) coupled with the existence of a phytovolatilization process. In fact, this plant ^{14}C -concentration decrease may provide indirect evidence of phytovolatilization [19].

CONFIDENTIEL

Table S2. Measured bioconcentration factors (*PCF*, *RCF*, *LCF*) and translocation factors (*TF*, *TSCF*) for DCB, TCB and γ HCH in *P. australis* plants.Superscripts ^{a,b} indicate differences at a significant level of 0.05 (ANOVA).

Contaminants	Exposure (days)	<i>RCF</i> Eq.(2)	<i>LCF</i> Eq.(3)	<i>PCF</i> Eq.(4)	<i>TSCF</i> Eq.(5)	<i>TF</i> Eq.(7)
DCB	7	16.03 ± 10.10 ^a	5.82 ± 4.18 ^a	13.86 ± 3.85 ^a	0.22 ± 0.21	0.97 ± 0.80
	14	21.15 ± 18.69 ^{ab}	3.01 ± 1.03 ^a	10.49 ± 7.84 ^{ab}	0.08 ± 0.03	0.67 ± 0.40
	21	18.24 ± 4.83 ^a	14.03 ± 8.01 ^{ab}	20.29 ± 3.72 ^{ab}	0.04 ± 0.03	1.35 ± 1.01
	28	75.56 ± 25.39 ^b	74.36 ± 28.20 ^b	59.30 ± 19.31 ^b	0.02 ± 0.009	0.93 ± 0.23
TCB	7	19.55 ± 10.44	1.72 ± 0.62 ^a	18.82 ± 3.37	0.07 ± 0.03	0.24 ± 0.19 ^a
	14	41.97 ± 26.21	7.13 ± 0.19 ^{ab}	32.31 ± 2.56	0.03 ± 0.01	0.47 ± 0.11 ^a
	21	46.98 ± 14.64	12.58 ± 5.46 ^b	36.66 ± 9.60	0.02 ± 0.007	0.28 ± 0.09 ^{ab}
	28	34.23 ± 14.65	19.65 ± 3.73 ^b	37.36 ± 11.60	0.07 ± 0.05	0.67 ± 0.13 ^b
γ HCH	7	23.40 ± 3.04	1.49 ± 0.44 ^a	14.64 ± 3.04	0.08 ± 0.006 ^a	0.07 ± 0.02 ^a
	14	14.65 ± 6.35	6.35 ± 3.41 ^{ab}	12.48 ± 3.82	1.04 ± 0.80 ^{ab}	0.34 ± 0.14 ^{ac}
	21	19.03 ± 4.29	12.00 ± 1.89 ^b	19.15 ± 3.64	0.38 ± 0.08 ^b	0.64 ± 0.02 ^b
	28	17.07 ± 4.17	5.96 ± 1.60 ^b	14.45 ± 2.65	0.33 ± 0.07 ^b	0.47 ± 0.13 ^c

Several studies have indicated that the ability of plants to volatilize POPs is influenced by the concentration and the physicochemical properties of POPs in plant growth media and by specific leaf area, cuticle thickness and transpiration rates, which can vary between plant species and with local ambient environmental conditions [43-45]. There have been few reports of phytovolatilization from leaves and stems in the literature, but it has been described for volatile solvents such as trichloroethylene, methyl-tert-butyl ether, BTEX [19, 24]. In this study, the volatilization of OCs by *P. australis* plants was measured directly, and was certainly undermined by the trap system used (Fig. 1, Table S1). The highest level of phytovolatilization was measured for DCB, with a final loss of 0.09%. This wastage of ^{14}C was detected from 2 days of exposure, and occurred regularly over the experimental period. TCB was also phytovolatilized, with a wastage of 0.02%, and ^{14}C wastage was detected after 4 days of exposure. The existence of volatilization from foliar surfaces to the atmosphere was suspected in *Holcus lanatus* plants exposed to DCB and TCB; this study clearly demonstrated that total mineralization ($^{14}\text{CO}_2$) by plants was <1% for all compounds [40].

In the case of γ HCH, uptake increased over the first 7 days of exposure and thereafter, was stationary (Fig. 3). The measured ^{14}C concentrations were at least 100 to 7 times higher than the $C_{p_{th}}$ values. γ HCH uptake in plants appeared to reach a saturation point with respect to *PCF* ratios saturation (Table S2) as has been described previously for ryegrass and wheat [25, 42]. γ HCH translocation appeared to occur in the plants, since the *LCF* ratio increased slightly

over the experimental time period, while the *RCF* decreased slightly (Table S2). Abhilash et al. [4] also detected γ HCH content in the leaves of different plant species, providing additional proof that γ HCH is translocated from roots to shoots. γ HCH was phytovolatilized, with a total wastage of 0.03%, and ^{14}C wastage was detected after 6 days of exposure. These observations may reflect a possible metabolism of γ HCH, producing more volatile metabolites such as chlorobenzenes [39].

These experiments have demonstrated that (i) DCB and TCB are first bioaccumulated in plants and secondly, may be phytovolatilized and that (ii) γ HCH is bioaccumulated in plants and is certainly partly metabolized.

3.3.2 ^{14}C -OCs translocation into plants

Based on the measurements taken at harvest, a good significant correlation has been found between DCB concentrations in each plant tissue pair, such as the root-rhizome pair (Fig. 4A) and rhizome-leaf pair (Fig. 4B) with $p < 0.0001$ and $p = 0.016$, respectively (z-test). These correlations show that DCB has been translocated from root to rhizome and finally to the leaf. Same correlation was obtained between TCB concentrations in roots and in rhizomes (Fig. 4C; $p = 0.008$), while there was no statistically relevant correlation between TCB concentrations in rhizomes and in leaves (Fig. 4D). This result contrasts with that of other studies on TCB, in which its concentrations inside rice plant tissues showed a good correlation between root-stalk and stalk-leaf [23]. In addition, there were no significant linear correlations, or non-linear correlations, between γ HCH concentrations in roots, rhizomes and leaves (Fig. 4E-F).

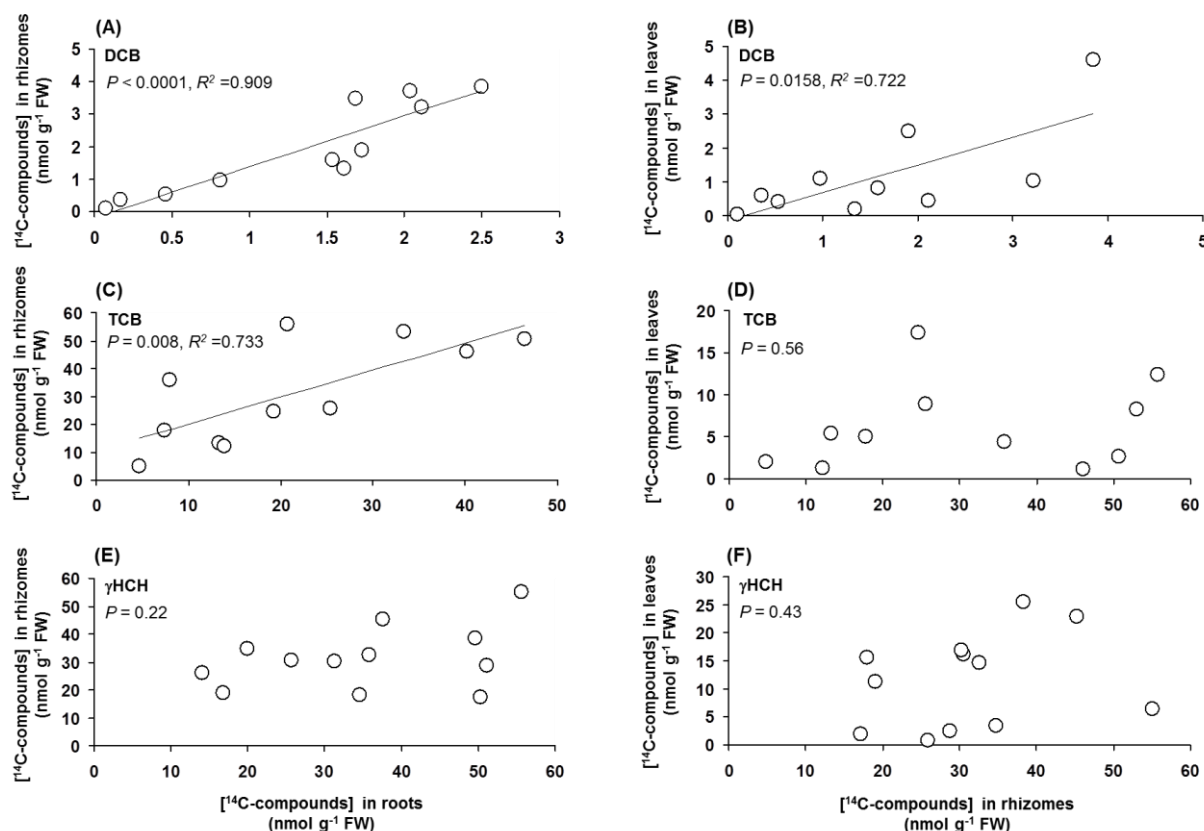


Figure 4 : Correlation between ^{14}C -compound concentrations in roots Vs rhizomes (A,C,E) and in rhizomes Vs leaves (B,D,F) when *P. australis* plants are exposed to DCB (A,B), TCB (C,D) and γHCH (E,F).

These data agree with those of previous studies that showed that OCs tend to be accumulated in roots instead of moving upward [37, 46]. No matter what the exposure time, the uptake and translocation of DCB, TCB and γHCH were not correlated to $\text{Log}K_{ow}$ (z-test for correlation at 28 days: $\text{Log}PCF - \text{Log}K_{ow}$, $p = 0.32$; $\text{Log}RCF - \text{Log}K_{ow}$, $p = 0.18$; $\text{Log}LCF - \text{Log}K_{ow}$, $p = 0.29$, for example). A non-linear relationship ($p = 0.7$) between the transpiration stream concentration factor ($TSCF$) and $\text{Log}K_{ow}$ has been observed as previously described [47]. Satchivi et al. [48] discussed the fact that translocation of xenobiotics might also be partly affected by the molar volume of molecules (Table 1). Their theoretical predictions showed that any xenobiotic with a molar volume not exceeding $300 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, with a $\text{Log}K_{ow} \geq 3$ might provide a poor translocation rate due to a high level of retention within the lipophilic parts of the tissues. This was confirmed using translocation factors (TF) to characterize chemical translocation from roots to the above-ground portion of the plant. TF values were all below 1, indicating that OCs were taken up by the roots but only moderately translocated into

the shoots (Table S2). No relevant correlations were obtained between TF and $\text{Log}K_{ow}$ for any exposure time.

Paterson et al. [37] and Collins et al. [49] have concluded that, for many of these organic compounds, translocation from roots to shoots is more efficient for chemicals of intermediate solubility. Relevant positive correlations were observed between DCB, TCB and γHCH uptakes and their solubility in water (SW) (z-test for correlation at 28days: $\text{Log}PCF\text{-}SW$, $p = 0.0058$, $R^2 = 0.810$; $\text{Log}RCF\text{-}SW$, $p = 0.014$, $R^2 = 0.763$; $\text{Log}LCF\text{-}SW$, $p = 0.0014$, $R^2 = 0.863$). In addition, the OCs with higher water solubility seemed to be translocated into shoots with the transpiration flow of the plant, an observation that was supported by relevant positive correlations ($p = 0.038$, $R^2 = 0.69$) between TF and SW (Fig. 5A).

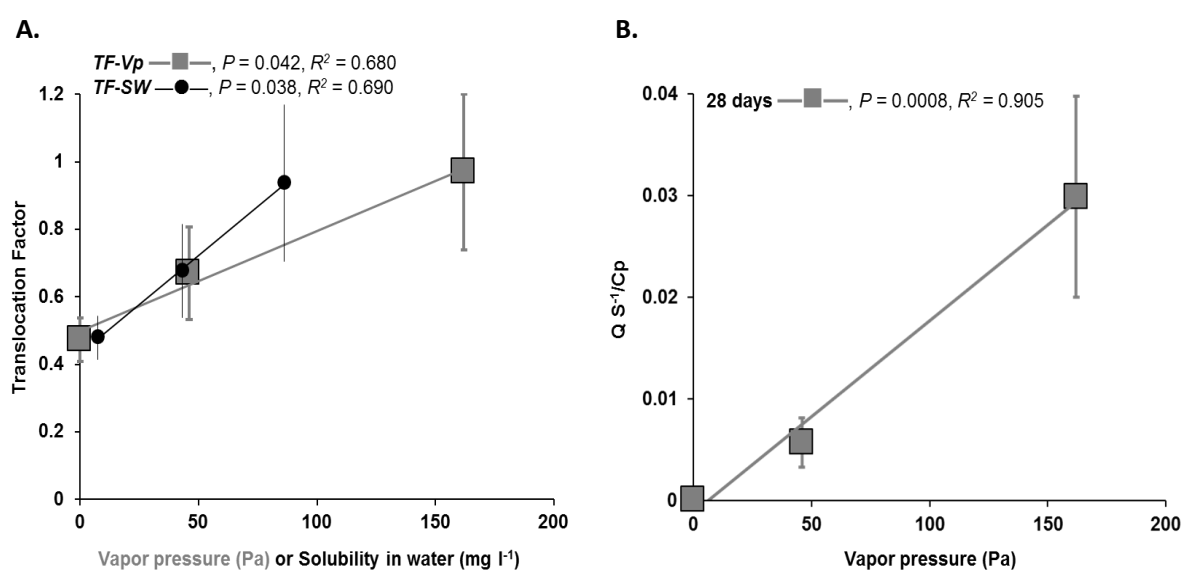


Figure 5 : Correlation between TF (A), $TSCF$ (B) and OC parameters (vapor pressure, solubility in water). Each point is the average of three replicates and standard error bars, mean \pm SE. TF and $TSCF$ values were calculated using Eq. (6) and Eq. (5), respectively.

However, translocation appears to be more complex, since the theoretical uptake calculations based on transpiration rate (Eq.(2), Table S1 and Fig. 3) showed that translocation was not just correlated to the solubility of the OCs. Moreover, $TSCF$ calculations [Eq.(5)] evolved with exposure time. At 7 days, the correlation between $TSCF\text{-}SW$ was very poor (z-test, $p = 0.255$, $R^2 = 0.47$) and calculated $TSCF$ values were of the same order as the theoretical ones (Eq. (5); $TSCF_{DCB} = 0.343$; $TSCF_{\gamma\text{HCH}} = 0.095$) with the exception of TCB (Eq. (5); $TSCF_{TCB} = 0.267$; measured $TSCF_{TCB} = 0.07$). The measured $TSCF_{TCB}$ value was similar to that measured with poplars [24]. Therefore the most water-soluble compounds are most likely to be translocated to shoots, which has already been demonstrated with different plants and xenobiotics [47].

Nevertheless, this *TSCF-SW* relationship had evolved to a negative linear correlation at 28 days ($p = 0.0071$, $R^2 = 0.8$) and was not consistent with theoretical values (Fig. 5B). This evolution may be related to the plant detoxification pathways that have been described as metabolizing (i) γ HCH in DCB, TCB, tetrachlorobenzene, pentachlorobenzene and chlorophenols [39], and (ii) chlorobenzenes in chlorophenols and conjugates [46]. Thus, the *TSCF* calculated with ^{14}C content would not represent the translocation of just the parent molecules. The measured *TSCF* _{γ HCH} (0.33 at 28 days) value was similar to the theoretical values calculated for chlorobenzenes. This result provides strong evidence for the existence of detoxification pathways producing metabolites that are more soluble and have a higher translocation rate (*e.g.* chlorobenzenes).

Paterson et al. [37] have suggested that the complicated translocation process is also affected by the vapor pressure (*Vp*) of organic pollutants (Table 1). Positive correlations were observed between LogPCF-Vp and LogRCF-Vp , but only at 28 days of exposure (Fig. 6A,C). Before 28 days, these correlations were not statistically relevant, but showed the same trend. In the case of *LCF* values, significant correlations were obtained for each exposure time between 7 and 28 days (Fig. 6B). Moreover, the *TF-Vp* correlations were statistically significant at 28 days (Fig. 6A; $p = 0.042$, $R^2 = 0.68$).

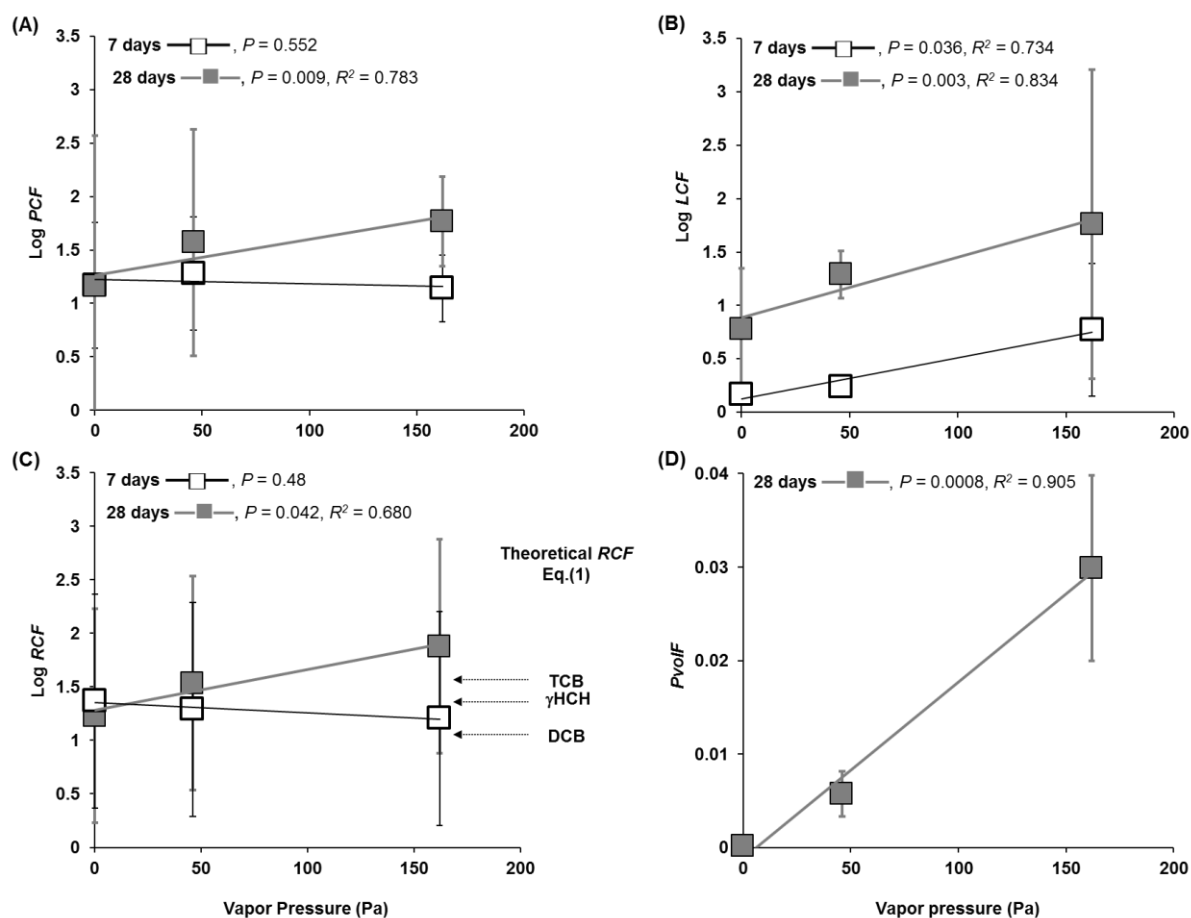


Figure 6 : Correlation between bioconcentration (*PCF* (A), *LCF* (B), *RCF* (C)), phytovolatilization (D) factors and OC volatility.

Each point is the average of three replicates and standard error bars, mean \pm SE. *PvolF* values were calculated using Eq. (7).

These correlations were based on the assumption that the most volatile OCs could be translocated inside the plant at a higher rate. It is possible to hypothesize the existence of a gas-phase diffusive flux within the lacunal/aerenchymatous system, with the convective flow of the OC vapor, at the scale of the entire plant [50]. This kind of volatile diffusive flux has been described for volatile trichloroethene in *Taxodium distichum* trees [51]. In addition, some wetland plants (especially helophytes) are known to take up contaminants through the root system and transfer them to the atmosphere *via* their transpiration stream or *via* their aerenchymatous tissues [19, 52]. No correlation between *TSCF* and *PvolF* (phytovolatilization factor) has been observed ($p = 0.114$), which does not agree with the foliar volatilization of trichloroethylene (higher solubility, 1 g l^{-1}) linked to the transpired flow [53]. A high correlation was obtained between *PvolF* and *Vp* (Fig. 6C; $p = 0.0008$, $R^2 =$

0.905). The latter result is a key argument in favor of the existence of a process of phytovolatilization from *P. australis* leaves.

4 Conclusion

OC uptake was much higher for less volatile and soluble compounds. At 28 days of exposure, plant absorption for DCB, TCB and γ HCH was $0.25 \pm 0.1\%$, $1.14 \pm 0.19\%$ and $15.6 \pm 0.54\%$, respectively. The uptake chronology revealed that volatile OCs were absorbed most during the first 7 days of exposure ($1.3 \pm 0.4\%$, $5.99 \pm 2\%$ respectively for DCB and TCB). This chronological decrease in plant OC content suggests that volatile OCs may be released from stems and leaves. Phytovolatilization was measured for all DCB, TCB and γ HCH exposures (at 28 days, 0.09%, 0.02% and 0.03% respectively).

Plant OC uptake is linked to a complex process involving the hydrophobicity, solubility and volatility of the compounds. OC absorption is strongly linked to the partition/diffusion process and is associated with a water flow absorption linked to the plant transpiration process. Most of the OCs that were absorbed were located in underground plant parts such as roots and rhizomes (partition process in the lipophilic membranes and lignified cell walls). OC translocation from roots to shoots was measured, and can mostly be explained by the addition of two major processes, (i) water flow transfer inside the vascular system and (ii) vapor fluxes inside the aerenchymatous system. These results therefore indicate that *P. australis* is suitable for the phytoextraction of OCs. The most appropriate constructed wetland technology would be a subsurface-flow wetland system, in order to limit the volatilization of OCs.

Acknowledgements

This work is part of VALORSITE-PHYCO project funded by AXELERA. The authors wish to thank Martha and John Willison for correcting the English text.

References

- [1] M.S. El-Shahawi, A. Hamza, A.S. Bashammakh, W.T. Al-Saggaf, An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants, *Talanta*, 80 (2010) 1587-1597.
- [2] J. Vijgen, P.C. Abhilash, Y.F. Li, R. Lal, M. Forter, J. Torres, N. Singh, M. Yunus, C.G. Tian, A. Schaffer, R. Weber, Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 18 (2011) 152-162.

- [3] K.S.B. Miglioranza, M. Sagrario, J.E.A. de Moreno, V.J. Moreno, A.H. Escalante, M.L. Osterrieth, Agricultural soil as a potential source of input of organochlorine pesticides into a nearby pond, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 9 (2002) 250-256.
- [4] P.C. Abhilash, S. Jamila, V. Singh, A. Singh, N. Singh, S.C. Srivastava, Occurrence and distribution of hexachlorocyclohexane isomers in vegetation samples from a contaminated area, *Chemosphere*, 72 (2008) 79-86.
- [5] M. Ricking, J. Schwarzbauer, HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin, Germany, *Environ. Chem. Lett.*, 6 (2008) 83-89.
- [6] R. Lal, G. Pandey, P. Sharma, K. Kumari, S. Malhotra, R. Pandey, V. Raina, H.P.E. Kohler, C. Holliger, C. Jackson, J.G. Oakeshott, Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74 (2010) 58-80.
- [7] C. Marvin, S. Painter, D. Williams, V. Richardson, R. Rossmann, P. Van Hoof, Spatial and temporal trends in surface water and sediment contamination in the Laurentian Great Lakes, *Environ. Pollut.*, 129 (2004) 131-144.
- [8] C. Turgut, L. Atatanir, T.J. Cutright, Evaluation of pesticide contamination in Dilek National Park, Turkey, *Environ. Monit. Assess.*, 170 (2010) 671-679.
- [9] B.Z. Fathepure, J.M. Tiedje, S.A. Boyd, Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to trichlorobenzenes and dichlorobenzenes in anaerobic sewage-sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (1988) 327-330.
- [10] H.M. Malcolm, P.D. Howe, S. Dobson, Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene: Environmental aspects, World Health Organization, Concise International Chemical Assessment Document 60 (2004).
- [11] A.A. Meharg, J. Wright, D. Osborn, Chlorobenzenes in rivers draining industrial catchments, *Sci. Total Environ.*, 251 (2000) 243-253.
- [12] X. Zhou, S.B. Deng, J. Huang, G. Yu, H.L. Lv, Occurrence and distribution of chlorobenzenes in the Tonghui River of Beijing, China, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 57 (2009) 32-41.
- [13] R. Haberl, S. Grego, G. Langergraber, R.H. Kadlec, A.R. Cicalini, S. Martins Dias, J.M. Novais, S. Aubert, A. Gerth, H. Thomas, A. Hebner, Constructed wetlands for the treatment of organic pollutants, *Journal of Soils and Sediments*, 3 (2003) 109-124.
- [14] P. Schroeder, J. Navarro-Avino, H. Azaizeh, A.G. Goldhirsh, S. DiGregorio, T. Komives, G. Langergraber, A. Lenz, E. Maestri, A.R. Memon, A. Ranalli, L. Sebastiani, S. Smrcek, T. Vanek, S. Vuilleumier, F. Wissing, Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 14 (2007) 490-497.
- [15] D.D. Tam, W.Y. Shiu, K. Qiang, D. Mackay, Uptake of chlorobenzenes by tissues of the soybean plant: Equilibria and kinetics, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 (1996) 489-494.
- [16] H. Kraaij, D.W. Connell, Bioconcentration and uptake kinetics of chlorobenzenes in soy-bean roots, *Chemosphere*, 34 (1997) 2607-2620.
- [17] J.Y. Zhang, W. Zhao, J. Pan, L.M. Qiu, Y.M. Zhu, Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area, *Environ. Int.*, 31 (2005) 855-860.
- [18] R. Calvelo Pereira, M. Camps-Arbestain, B.R. Garrido, F. Macias, C. Monterroso, Behaviour of alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site, *Environ. Pollut.*, 144 (2006) 210-217.
- [19] X.M. Ma, J.G. Burken, VOCs fate and partitioning in vegetation: Use of tree cores in groundwater analysis, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 4663-4668.
- [20] C. Gomez-Hermosillo, J.H. Pardue, D.D. Reible, Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments, *Environ. Sci. Technol.*, 40 (2006) 3229-3236.
- [21] M.V. Monferran, D.A. Wunderlin, J. Nimptsch, S. Pflugmacher, Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene, *Chemosphere*, 68 (2007) 2073-2079.
- [22] X.M. Ma, M.M. Havelka, Phytotoxicity of chlorinated benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*, *Environ. Toxicol.*, 24 (2009) 43-48.

- [23] Y.W. He, T.H. Sun, Z.Q. Ou, A. Yediler, A. Kettrup, Fate of 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB) in soil-rice paddy system, *Chemosphere*, 32 (1996) 1381-1389.
- [24] A.C. Dietz, J.L. Schnoor, Advances in phytoremediation, *Environ. Health Perspect.*, 109 (2001) 163-168.
- [25] H. Li, G.Y. Sheng, C.T. Chiou, O.Y. Xu, Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 4864-4870.
- [26] Y.H. Su, Y.G. Zhu, Transport mechanisms for the uptake of organic compounds by rice (*Oryza sativa*) roots, *Environ. Pollut.*, 148 (2007) 94-100.
- [27] M. Faure, A. San Miguel, P. Ravanel, M. Raveton, Dose responses to organochlorines in *Phragmites australis*, *Chemosphere*, (submitted).
- [28] G.G. Briggs, R.H. Bromilow, A.A. Evans, Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley, *Pesticide Science*, 13 (1982) 495-504.
- [29] A. Aajoud, M. Raveton, H. Aouadi, M. Tissut, P. Ravanel, Uptake and xylem transport of fipronil in sunflower, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 5055-5060.
- [30] S. Trapp, Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 11 (2004) 33-39.
- [31] H.J. Zhang, J.P. Chen, Y.W. Ni, Q. Zhang, L. Zhao, Uptake by roots and translocation to shoots of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in typical crop plants, *Chemosphere*, 76 (2009) 740-746.
- [32] B. Rocheleau, B. Lachance, R.G. Kuperman, J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman, G.I. Sunahara, Toxicity and uptake of cyclic nitramine explosives in ryegrass *Lolium perenne*, *Environ. Pollut.*, 156 (2008) 199-206.
- [33] M. Raveton, P. Ravanel, A.M. Serre, F. Nurit, M. Tissut, Kinetics of uptake and metabolism of atrazine in model plant systems, *Pestic. Sci.*, 49 (1997) 157-163.
- [34] M. Raveton, A. Schneider, C. Desprez-Durand, P. Ravanel, M. Tissut, Comparative diffusion of atrazine inside aqueous or organic matrices and inside plant seedlings, *Pest. Biochem. Physiol.*, 65 (1999) 36-43.
- [35] Y.Z. Gao, W. Xiong, W.T. Ling, H. Wang, L.L. Ren, Z.Y. Yang, Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between plant roots and water, *Plant Soil*, 311 (2008) 201-209.
- [36] R. Calvelo Pereira, C. Monterroso, F. Macias, M. Camps-Arbestain, Distribution pathways of hexachlorocyclohexane isomers in a soil-plant-air system. A case study with *Cynara scolymus* L. and *Erica* sp plants grown in a contaminated site, *Environ. Pollut.*, 155 (2008) 350-358.
- [37] S. Paterson, D. Mackay, D. Tam, W.Y. Shiu, Uptake of organic-chemicals by plants- A review of processes, correlations and models, *Chemosphere*, 21 (1990) 297-331.
- [38] A. Soukup, W. Armstrong, L. Schreiber, R. Franke, O. Votrubova, Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*, *New Phytologist*, 173 (2007) 264-278.
- [39] M.H. Balba, J.G. Saha, Metabolism of lindane 14C by wheat plants grown from treated seed, *Environmental Letters*, 7 (1974) 181-194.
- [40] S.C. Wilson, A.A. Meharg, Investigation of organic xenobiotic transfers, partitioning and processing in air-soil-plant systems using a microcosm apparatus. Part II: comparing the fate of chlorobenzenes in grass planted soil, *Chemosphere*, 53 (2003) 583-591.
- [41] G. Imfeld, M. Braeckevelt, P. Kuschik, H.H. Richnow, Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands, *Chemosphere*, 74 (2009) 349-362.
- [42] H. Li, G.Y. Sheng, W.T. Sheng, O.Y. Xu, Up take of trifluralin and lindane from water by ryegrass, *Chemosphere*, 48 (2002) 335-341.
- [43] X.Z. Yu, J.D. Gu, Uptake, metabolism, and toxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) in weeping willows, *J. Hazard. Mater.*, 137 (2006) 1417-1423.
- [44] F. Mothes, N. Reiche, P. Fiedler, M. Moeder, H. Borsdorf, Capability of headspace based sample preparation methods for the determination of methyl tert-butyl ether and benzene in reed (*Phragmites australis*) from constructed wetlands, *Chemosphere*, 80 (2010) 396-403.

- [45] P.C. Abhilash, N. Singh, *Withania somnifera* Dunal-mediated dissipation of lindane from simulated soil: implications for rhizoremediation of contaminated soil, *J. Soils Sediments*, 10 (2010) 272-282.
- [46] E. Topp, I. Scheunert, F. Korte, Kinetics of the uptake of ^{14}C -labeled chlorinated benzenes from soil by plants *Ecotox. Environ. Safe.*, 17 (1989) 157-166.
- [47] E.M. Dettenmaier, W.J. Doucette, B. Bugbee, Chemical hydrophobicity and uptake by plant roots, *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 324-329.
- [48] N.M. Satchivi, E.W. Stoller, L.M. Wax, D.P. Briskin, A nonlinear, dynamic, simulation model for transport, and whole plant allocation of systemic xenobiotics following foliar application. IV: Physicochemical properties requirements for optimum absorption and translocation, *Pest. Biochem. Physiol.*, 84 (2006) 83-97.
- [49] C. Collins, M. Fryer, A. Grosso, Plant uptake of non-ionic organic chemicals, *Environ. Sci. Technol.*, 40 (2006) 45-52.
- [50] S. Vogel, Contributions to the functional anatomy and biology of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) I. Pathways of air circulation, *Plant Syst. Evol.*, 249 (2004) 9-25.
- [51] C.T. Nietch, J.T. Morris, D.A. Vroblesky, Biophysical mechanisms of trichloroethane uptake and loss in baldcypress growing in shallow contaminated groundwater, *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 2899-2904.
- [52] M.S. Hong, W.F. Farmayan, I.J. Dortch, C.Y. Chiang, Phytoremediation of MTBE from a groundwater plume, *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 1231-1239.
- [53] W.J. Doucette, B. Bugbee, S.C. Smith, C. Pajak, J.S. Ginn, Uptake, metabolism, and phytovolatilization of trichloroethylene by indigenous vegetation: impact of precipitation, In: *Phytoremediation, transformation and control of contaminants*. McCutcheon, S.C. and Schnoor, J.L. (Eds), John Wiley and Sons, Inc. New York, (2003) 561-588.
- [54] D. Djohan, Q. Yu, D.W. Connell, Partition isotherms of chlorobenzenes in a sediment-water system, *Water Air Soil Pollut.*, 161 (2005) 157-173.
- [55] D. Mackay, W.Y. Shiu, K.-C. Ma, *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties of Environmental Fate for Organic Chemicals*, CRC Press., (1997).
- [56] K.U. Goss, H.P.H. Arp, G. Bronner, C. Niederer, Partition behavior of hexachlorocyclohexane isomers, *J. Chem. Eng. Data*, 53 (2008) 750-754.

Chapitre III

Etude des activités enzymatiques de détoxication chez Phragmites australis

I. Problématique et démarche de l'étude

1. Contexte général

L'absorption des OCs par *P. australis* a permis de mettre en évidence le transfert et la localisation des OCs dans les organes de la plante. Cependant au niveau cellulaire, les OCs peuvent être pris en charge par le système enzymatique de détoxification: (i) la phase I de déchloration par réduction et/ou oxydation, (ii) la phase II de conjugaison, (iii) la phase III de transport et de stockage dans les vacuoles ou dans les parois cellulaires de la plante (Schröder et al. 2007)(cf **Introduction § 5**). Jusqu'à présent quelques études ont été réalisées sur les mécanismes mis en jeu dans la détoxification des pesticides chez les plantes aquatiques démontrant que les OCs pouvaient induire ou inhiber des activités enzymatiques telles que les GSTs ou les UGTs (Sinha 2002, Schröder et al. 2005, Menone et al. 2008).

Ce troisième chapitre traite de l'impact des OCs sur les mécanismes physiologiques de détoxification de phase II chez *P. australis*, permettant une meilleure compréhension des processus d'induction et d'inhibition des activités enzymatiques GSTs et UGTs (**Publication 4**). Ces mesures d'activités enzymatiques ont été évaluées dans les conditions suivantes : (i) en mono-exposition (NOEC_{7jours}) de chacun des OCs et (ii) en multi-exposition des OCs en NOEC_{7jours} (MIX) (cf **Chapitre 1**).

2. Approche expérimentale

Après traitement aux concentrations NOEC, les plantes de *P. australis* sont disséquées : Parties Aériennes (PA), Rhizomes (Rh) et Racines (R) (**Fig 51**). Les GSTs et les UGTs sont ensuite extraits pour mesurer leur activité dans chacun des compartiments.

L'activité des GSTs est mesurée *in vitro* en utilisant des substrats spécifiques de chacune des classes d'enzymes. L'activité des classes Phi et Tau avec leur pouvoir conjuguant sur un large éventail de xénobiotiques peut être mise en évidence et facilement déterminée en utilisant le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) comme substrat (Moons 2005). L'activité de conjugaison des GSTs de la classe Tau est spécifiquement mesurée en utilisant le fluorodifen (herbicide) comme substrat (Thom et al. 2002, Dixon et al. 2003). Les GSTs Theta catalysent spécifiquement la conjugaison du 4-nitrobenzylchloride (pNBC) (Moons 2005). L'utilisation de ces différents substrats permet de mesurer sélectivement l'activité de conjugaison respective de chacune des classes de GSTs.

L'activité des UGTs est mesurée *in vitro* en utilisant le 2,4,5-trichlorophenol (TCP) comme substrat. La synthèse de conjugué glucose-trichlorobenzène et la disparition de TCP sont dosées par HPLC.

1) Impact des OCs en mono-exposition sur les activités GSTs

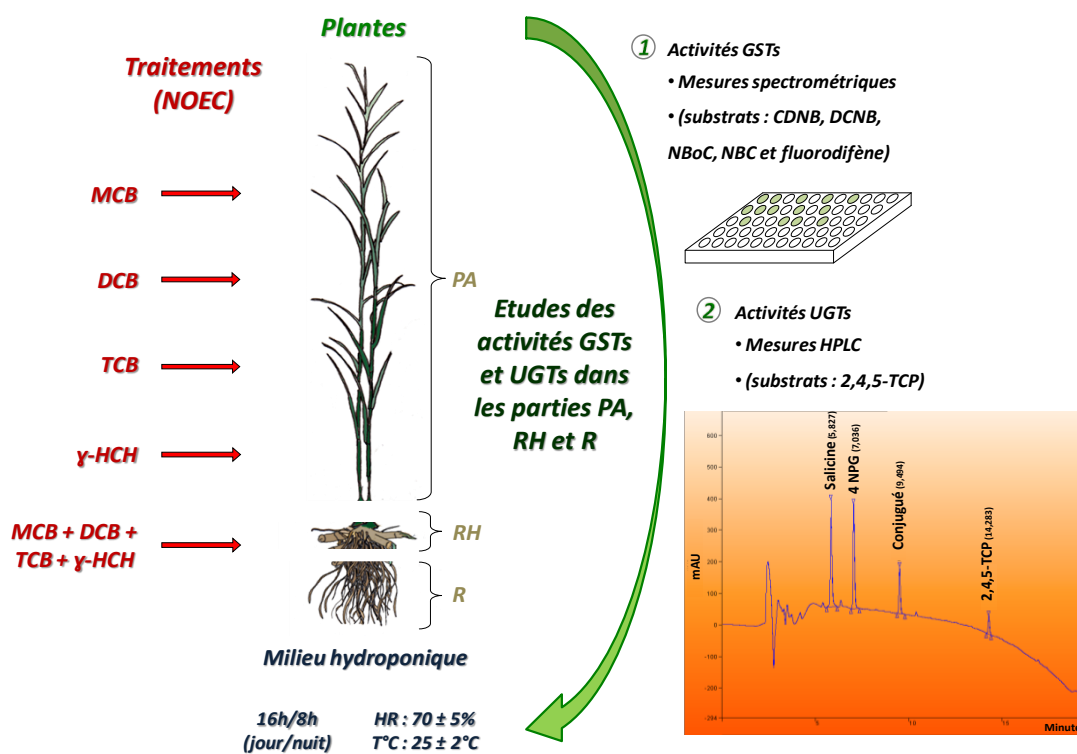


Figure 51 : Schéma expérimentale pour la mise en évidence des activités de détoxification chez la plante. Protocoles ①② : **Publication 4**. HR : humidité Relative.

PA : Partie Aérienne ; Rh : rhizomes et R : Racines.

II. Résultats et discussion

1. Impact des OCs en mono-exposition sur les activités GSTs et UGTs

Les premières mesures d'activités enzymatiques de phase II ont été réalisées en mono-exposition et aux concentrations NOEC_{7jours} afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications des mécanismes de détoxication chez les plantes traitées.

Les résultats reportés dans le **Tableau 13** montrent que les OCs induisent peu d'effets sur les activités GSTs au niveau des organes souterrains des plantes. Sur les racines et les rhizomes, les activités fluorodifène-GST sont significativement réduites de 50%. Les modifications d'activités sont majoritairement visibles au niveau des feuilles avec des activités significativement induites (en rouge ; DCNB et NBOC) après chaque traitement par rapport aux plantes témoins et en particulier avec le γ -HCH. Des inhibitions (en bleu) sont également visibles en présence de fluorodifène. Dans l'ensemble, il ne semble pas y avoir de fortes modifications des activités GSTs après expositions aux OCs (NOEC_{7jours}, 7 jours d'exposition).

Tableau 13 : Activités des GSTs mesurées dans les racines, les rhizomes et les feuilles de *P. australis* exposées pendant 7 jours au MCB, DCB, TCB et γ HCH en NOEC_{7jours} (MCB=0,8 mg l⁻¹; DCB=0,8 mg l⁻¹; TCB=10 mg l⁻¹ et HCH=0,7 mg l⁻¹).

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ES (n = 3). *, P<0,05 ; **, P<0,01 ; ***, P<0,001 (Mann-Whitney).

		Activités GST (μ kat g ⁻¹)		
		Roots	Rhizomes	Leaves
Control	CDNB	1.11 \pm 0.19	2.52 \pm 0.50	3.96 \pm 0.48
	DCNB	0.004 \pm 0.003	0.004 \pm 0.002	0.006 \pm 0.003
	NBoC	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.02
	NBC	0.07 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.33 \pm 0.08
	Fluorodifen	1.34 \pm 0.16	1.55 \pm 0.18	1.42 \pm 0.13
MCB	CDNB	0.74 \pm 0.31	2.92 \pm 0.40	2.98 \pm 0.30*
	DCNB	0.011 \pm 0.005	0.009 \pm 0.005	0.010 \pm 0.002*
	NBoC	0.00 \pm 0.18	0.00 \pm 0.03	0.00 \pm 0.03
	NBC	0.05 \pm 0.03	0.25 \pm 0.06	0.23 \pm 0.01
	Fluorodifen	1.51 \pm 0.14	1.37 \pm 0.07	1.45 \pm 0.04
DCB	CDNB	1.04 \pm 0.40	1.19 \pm 0.41	3.14 \pm 0.29
	DCNB	0.004 \pm 0.003	0.005 \pm 0.004	0.000 \pm 0.000
	NBoC	0.00 \pm 0.03	0.002 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02***
	NBC	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.24 \pm 0.07
	Fluorodifen	0.65 \pm 0.04**	0.64 \pm 0.02**	0.70 \pm 0.04**
TCB	CDNB	1.12 \pm 0.10	3.62 \pm 0.20	3.79 \pm 0.06
	DCNB	0.014 \pm 0.005	0.009 \pm 0.001	0.013 \pm 0.003
	NBoC	0.00 \pm 0.06	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.003***
	NBC	0.12 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.43 \pm 0.16
	Fluorodifen	0.64 \pm 0.02**	0.66 \pm 0.02**	0.65 \pm 0.02**
HCH	CDNB	0.41 \pm 0.09 *	1.48 \pm 0.06	3.08 \pm 0.77
	DCNB	0.016 \pm 0.002	0.009 \pm 0.001	0.018 \pm 0.011*
	NBoC	0.07 \pm 0.03**	0.00 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02***
	NBC	0.06 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
	Fluorodifen	0.70 \pm 0.03**	0.60 \pm 0.07**	0.67 \pm 0.01**

Les expositions OCs (NOEC_{7jours}) ne modifient pas les activités UGT au niveau des feuilles. Cependant, ces activités UGT sont modifiées dans les organes souterrains, racines et rhizomes (**Fig 52**) montrant des tendances inverses entre ces deux organes. Pour les expositions au DCB et HCH, les UGTs sont inhibées dans les racines (60% et 40%, respectivement) alors qu'elles sont induites dans les rhizomes (65%). Par contre, les UGTs sont induites par le TCB dans les racines (40%) alors qu'elles sont inhibées par le MCB et TCB (35% et 50% respectivement) dans les rhizomes. Avec des inductions et

des inhibitions d'activités importantes au niveau des organes directement en contact avec les OCs, il semblerait que ces composés chlorés jouent un rôle non négligeable sur les fonctions enzymatiques détoxifiantes de type UGTs.

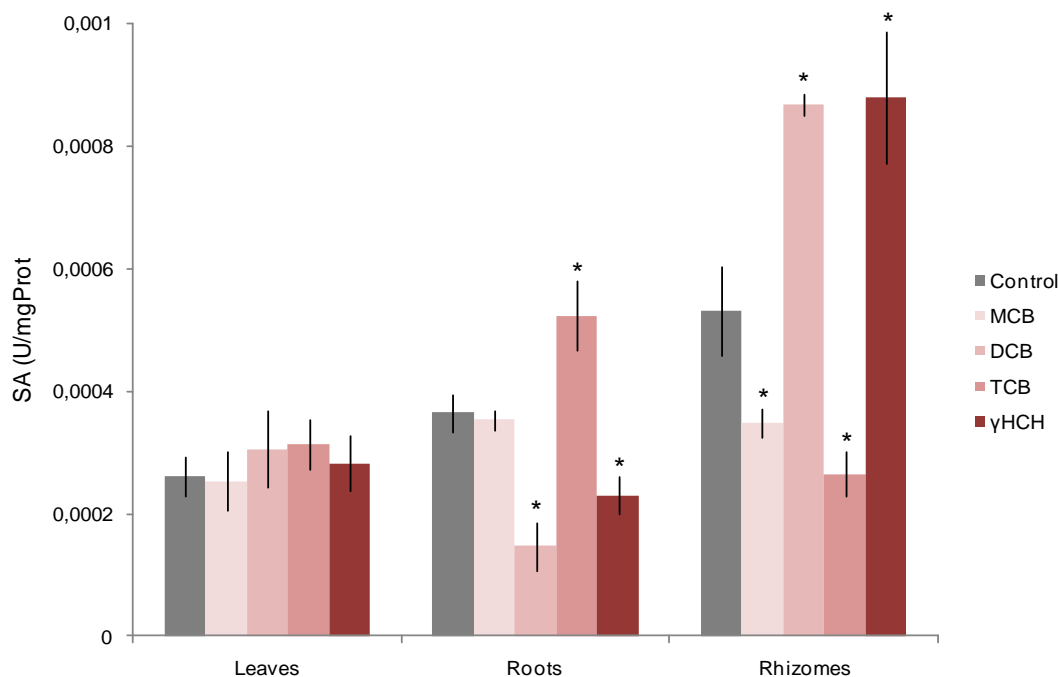


Figure 52 : Activités UGTs mesurées dans chaque compartiment : racines, rhizomes et feuilles, des plantes de *P. australis* exposées pendant 7 jours au MCB, DCB, TCB et γHCH en NOEC_{7jours} (MCB=0,8 mg l⁻¹; DCB=0,8 mg l⁻¹; TCB=10 mg l⁻¹ et HCH=0,7 mg l⁻¹). Les valeurs correspondent à la moyenne ± ES (n = 3) * P<0,05 (Mann-Whitney).

2. Impact des OCs en multi-exposition sur les activités GSTs et UGTs

Les plantes *P. australis* ont été exposées au mélange des OCs (NOEC_{7jours} : 0,2 mg l⁻¹ MCB + 0,2 mg l⁻¹ DCB + 2,5 mg l⁻¹ TCB + 0,175 mg l⁻¹ HCH).

Les activités GST ne sont pas induites par la multi-exposition des OCs étudiés. Par contre, les activités fluorodifène-GST sont significativement diminuées de 40% dans l'ensemble des organes (**Tableau 14**) et les activités DCNB-GST sont inhibées, voire presque non détectables, dans les racines et les feuilles. Dans les rhizomes, les activités NBC-GST sont significativement réduites de 75%.

Tableau 14 : Activités des GSTs mesurées dans les racines, les rhizomes et les feuilles de *P. australis* exposées pendant 7 jours au mélange d'OCs (0,2 mg l⁻¹ MCB + 0,2 mg l⁻¹ DCB + 2,5 mg l⁻¹ TCB + 0,175 mg l⁻¹ HCH).

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ES (n = 3). *, P<0.05 (Mann-Whitney).

		Activités GST (μ kat g ⁻¹)		
		Racines	Rhizomes	Feuilles
Control	CDNB	1,7 \pm 0,37	2,53 \pm 1,32	4,05 \pm 1,08
	DCNB	0,013 \pm 0,002	0,009 \pm 0,006	0,028 \pm 0,028
	NBoC	0,00 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,03
	NBC	0,11 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03
	Fluorodifen	1,82 \pm 0,03	1,94 \pm 0,08	1,8 \pm 0,03
MIX	CDNB	1,89 \pm 1,02	2,48 \pm 0,61	5,5 \pm 0,58
	DCNB	0,00 \pm 0,004*	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01*
	NBoC	0,00 \pm 0,02	0,00 \pm 0,003	0,00 \pm 0,005
	NBC	0,09 \pm 0,07	0,06 \pm 0,05*	0,31 \pm 0,03
	Fluorodifen	1,11 \pm 0,01*	1,18 \pm 0,04*	1,18 \pm 0,001*

Les activités UGTs ne sont pas modifiées par la multi-exposition dans les racines (Fig 53). Les activités UGTs au niveau des rhizomes sont significativement réduites de 75% alors qu'une induction (118%) est mesurée au niveau des parties aériennes de la plante *P. australis*.

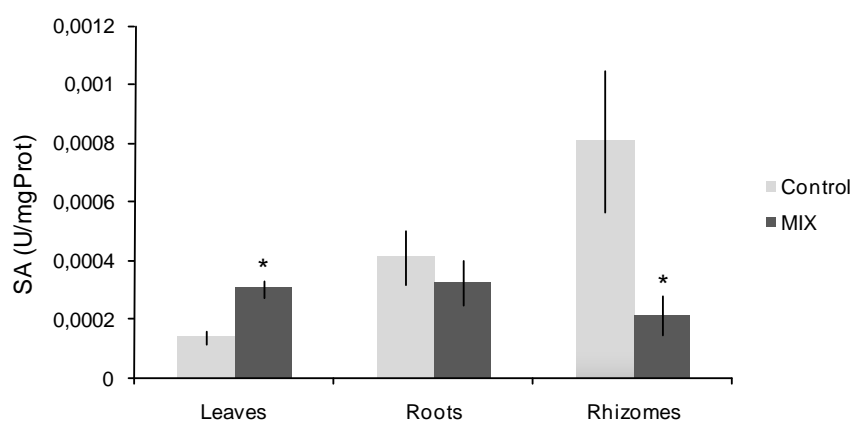


Figure 53 : Activité des UGTs dans les tissus (racines, rhizomes, feuilles) de *P. australis* exposées pendant 7 jours au mélange d'OCs (0,2 mg l⁻¹ MCB + 0,2 mg l⁻¹ DCB + 2,5 mg l⁻¹ TCB + 0,175 mg l⁻¹ HCH). Les valeurs représentent la moyenne \pm ES (n = 3). *, P<0,05 (Mann-Whitney).

III. Conclusions

Les résultats de phytotoxicité ont démontré chez *P. australis*, une certaine tolérance aux OCs (**Chapitre 1, publication 2**). L'hypothèse avancée concernant cette tolérance pourrait se référer à l'existence d'un réseau enzymatique de phytodégradation des OCs. Cette hypothèse est basée sur des travaux antérieurs démontrant la possibilité (i) d'une phase I de déchloration pouvant être catalysée par des monooxygénases P450 (Ryan et al. 1981, Fonnepister and Kreuz 1990, Loureiro et al. 2010), des peroxydases (Stazi et al. 2001, Jansen et al. 2004, Biswas et al. 2010), des réductases (Magee et al. 2008) ou des déhalogénases (Susarla et al. 2002), et (ii) d'une phase II de conjugaison catalysée par les GSTs et/ou les UGTs (Edwards et al. 2000, Cummins et al. 2011) (Messner et al. 2003, Petroutsos et al. 2007b). Dans le cas de *P. australis* l'exposition aux OCs semblent modifier les activités GSTs et UGTs.

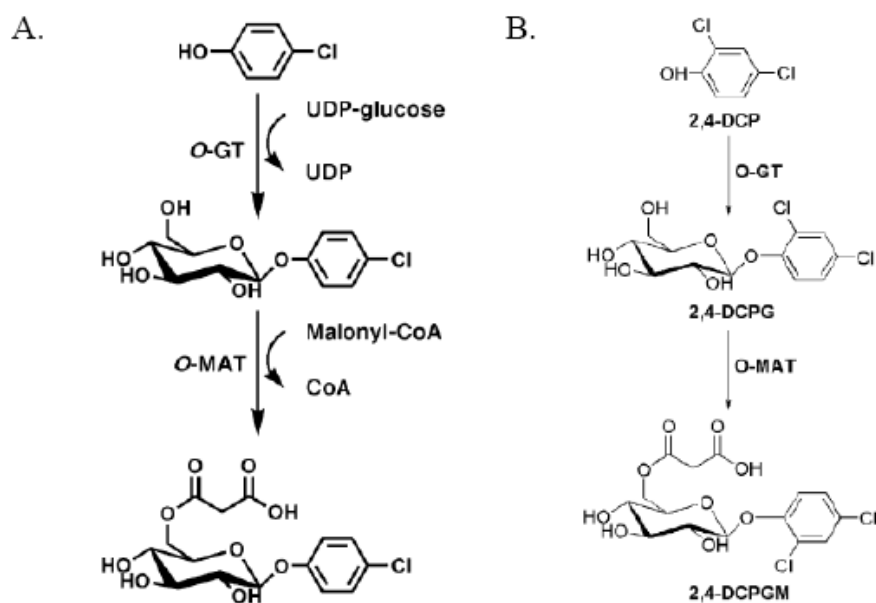


Figure 54 : **A.** Métabolisation du *p*. Chlorophenol observé chez *Tetraselmis marina*. O-GT : O-glucosyltransferase. O-MAT : O-malonyltransferase (Petroutsos et al., 2007) **B.** Métabolisation du 2,4-DCP chez *T. marina* ; O-GT : O-glucosyltransferase, O-MAT : O-malonyltransferase, 2,4 -dichlorophénol, 2,4-DCPG : 2,4-dichlorophenyl-β-D-glucopyranoside, 2,4-DCPGM : 2,4-dichlorophenyl-β-D-(6-O-malonyl)-glucopyranoside.

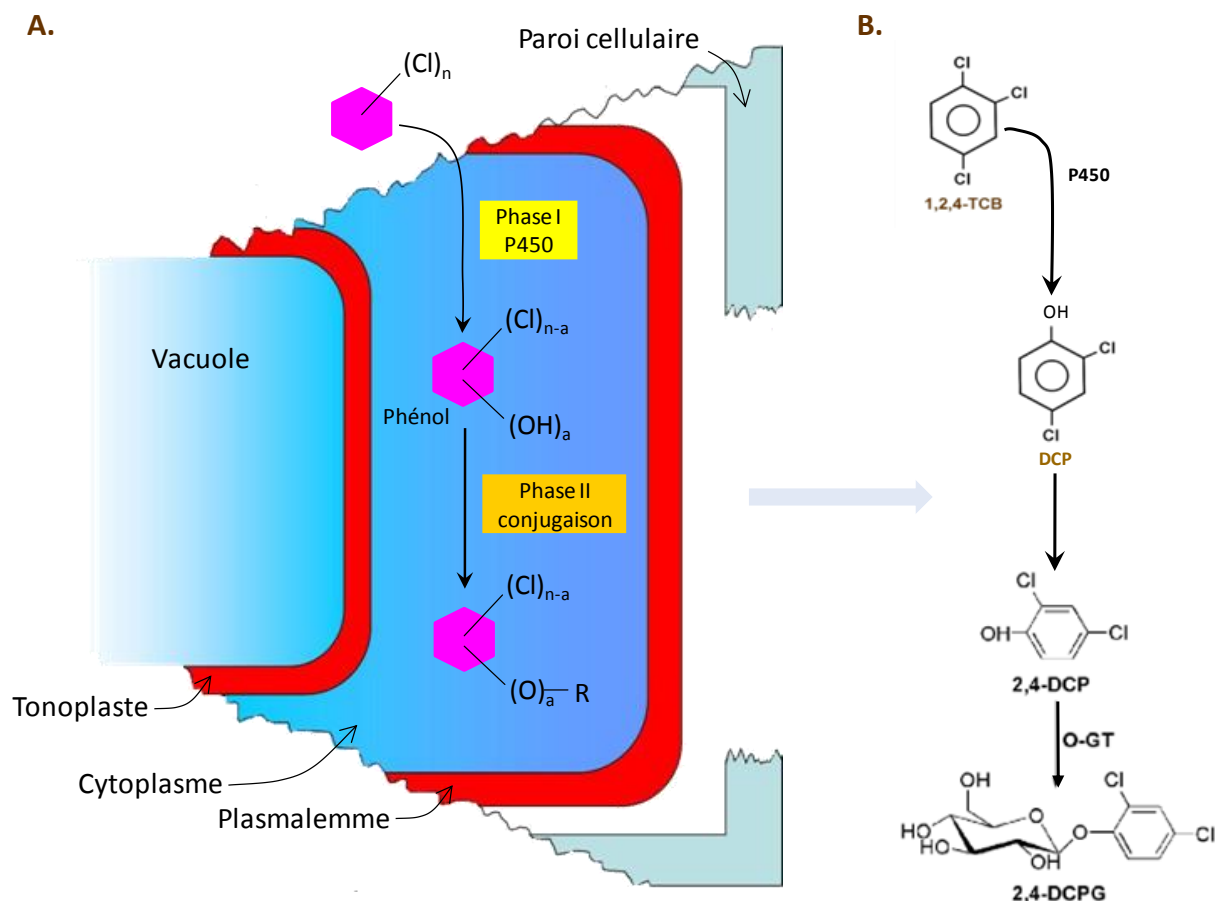


Figure 55 : **A.** Schéma récapitulatif du mécanisme de métabolisation dans la cellule végétale à partir d'un organochloré, **B.** Schéma hypothétique de phytodégradation du 1,2,4-TCB par les enzymes de phase I, puis conjugaison du produit formé par les enzymes UGTs (*Tetraselmis marina* par Petroutsos et al., 2007). R :

Conjugué, OCs : c1ccccc1Cl

Les activités GSTs les plus significativement différentes du témoin en mono-exposition, semblent être localisées particulièrement dans les feuilles et ce, pour chacune des molécules. Cependant, les différences observées sont majoritairement des effets inhibiteurs sauf pour les DCNB- et NBOC-GSTs où des inductions significatives ont été mesurées. Cependant lorsque les plantes sont exposées à un mélange OCs (se rapprochant des conditions *in situ*), les GSTs ne sont plus induites, seules les inhibitions précédemment observées en mono-exposition persistent. Notre hypothèse serait que cette voie métabolique catalysée par les GSTs ne soit pas la voie principale de conjugaison des OCs. Pour confirmer cette hypothèse, (i) il faudrait vérifier l'intensité des activités GST en fonction du temps d'exposition pour connaître la chronologie de

l'induction ou de l'inhibition, puis (ii) tester la réponse *in vitro* en fonction d'une gamme de concentration en OCs.

Les OCs et leurs métabolites de phase I semblent susceptibles d'être pris en charge par les UGTs. En effet, des études préalables ont permis de mettre en évidence la conjugaison des formes hydroxylées du DCB et du TCB par les UGTs, chez des espèces d'algues *Tetraselmis marina* (**Fig 54**) (Petroutsos et al. 2007a). Dans le cas de *P. australis*, nous pouvons envisager une gestion des OCs similaires (**Fig 55B**). Nos mesures ont montré que les OCs sont capables d'activer ou d'inhiber de façon significative les activités UGTs dans les parties souterraines. Cependant en conditions de multi-exposition aux OCs, l'induction des UGTs est mesurée uniquement au niveau des parties foliaires. L'induction des UGTs mesurée dans l'ensemble des organes de *P. australis* conforte l'hypothèse où les OCs et leurs métabolites de type chlorophénol seraient conjugués à des sucres. La différence d'induction des UGTs entre les cas de mono- et multi-expositions peut s'expliquer par le paramètre 'durée d'exposition' fixé à 7 jours. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre (i) l'induction temporelle des UGTs sur des temps d'exposition plus courts (laquelle des deux activités enzymatiques est induite/inhibée en premier) et (ii) la succession des activités GSTs et UGTs entre les organes (prendre en compte la différence des effets en fonction du type d'organe).

Publication 4

En préparation pour Environmental Science and Pollution Research

Response of Phase II detoxication enzymes in *Phragmites australis* plants exposed to organochlorines

Angélique San Miguel^a, Peter Schröder^b, Rudolf Harpaintner^b, Patrick Ravanel^a, Muriel Raveton^{a*}

^aLaboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

^bHelmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) Ingolstädter Landstrasse 1 85764 Neuherberg, Germany.

Abstract

Purpose: Mixed pollution with organic compounds is a characteristic of many industrial sites and constructed wetlands. Plants possessing an enzymatic defense system that is able to handle xenobiotics show strong tolerance to such pollutant exposure. Thus, phytoremediation seems to be a viable option for the removal of mixed pollution in the environment. In this study, the ability of plants to detoxify OCs (organochlorines: MCB, monochlorobenzene; DCB, 1,4-dichlorobenzene; TCB, 1,2,4-trichlorobenzene; HCH, γ -hexachlorocyclohexane) using phase II enzymes, has been investigated. Enzyme performance was compared for sublethal concentrations of OCs (single and mixed exposures).

Methods *Phragmites australis* plants were grown under controlled conditions, in a hydroponic solution. For each single-exposure congener, (0.8 to 10 mg l⁻¹) and for exposure to the mixture of OCs (0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH), exposures were carried out at the NOEC_{7days} level. Studies were conducted on the detoxification enzymes glutathione S-transferase (GST) and glucosyltransferase (UGT).

Results Measurements of GST and UGT activities revealed that OCs may be buffered by glutathione and glucose conjugation. There appeared to be a correlation between the effects on phase II enzymes and the degree of chlorination of the benzene ring, with, for example, the greatest effects being obtained for HCH exposure. In the case of mixed pollution, the induction of some GST isoenzymes (CDNB, 35% non-significant) and UGT (118%) in leaves, and the inhibition of phase II enzymes in the other organs, were measured.

Conclusions *Phragmites australis* plants were tolerant to mixed OC environmental pollution, due to their detoxification capabilities. UGTs appear to be key enzymes in the detoxification of OCs.

1 Background, aim, and scope

Organochlorines (OCs) are an important class of xenobiotics listed as priority environmental pollutants by the Stockholm Convention [1]. In the past, Lindane (γ -hexachlorocyclohexane, HCH) was one of the most extensively used organochlorine (OC) pesticides, designed to control a wide range of agricultural, horticultural and public health pests [2]. The application of HCH has resulted in environmental contamination of global dimensions [1]. Around the world, a range of HCH isomer concentrations, from 4 to 125,280 mg kg⁻¹, have been detected in soils, the most contaminated areas corresponding to former industrial or waste disposal sites and, finally, agricultural soils [3, 4]. Environmental residues of HCH isomers have now been reported in surface waters ranging from 0.41 to 2.8 ng l⁻¹ [5, 6]. Contaminated sediments have been found with concentrations ranging from 1.95 to 11.05 μ g kg⁻¹ [7, 8] with levels up to 396 μ g kg⁻¹ near industrial areas [9].

The dispersal of HCH in the environment has led to contamination of the anaerobic and aerobic compartments, in which microbial biodegradation occurs [6]. Several studies have reported the production of chlorobenzenes (CBs) by microorganisms, during the anaerobic degradation of HCH and, in a minority of cases, during the aerobic pathway [6, 9]. MCB (monochlorobenzene), DCB (1,2- and 1,4-dichlorobenzene) and TCB (1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene) appear to be the stable end products of the dechlorination process and they may accumulate in the natural environment [10, 11]. Concentrations of CBs in the environment vary, ranging from 0.07 to 34.79 ng l⁻¹ for water industrial catchments [12] and from 0.4 to 5.8 μ g kg⁻¹ in sediments [13]. These OCs (HCH and CB metabolites) are chemically stable, with high *n*-octanol/water partition coefficients, and, as a consequence, bioaccumulation may be expected in organisms [14, 15].

Plants are exposed to mixed pollution, especially in constructed wetlands where contaminated water and sediment flow into the lagoons for remediation treatment. There have been some studies of OC uptake by aquatic plant [16-23]. Wetland plants such as *Phragmites communis* and *Typha angustifolia* have shown potential for the phytoremediation of chlorinated contaminants [22, 24, 25]. *Phragmites* plants appear to tolerate OCs, since the reactive oxygen species generated by OC-exposure have been shown to be scavenged efficiently by antioxidant enzymes [26].

Little information is currently available concerning the detoxification pathways used to handle chlorinated compounds in aquatic plants. Most studies have been carried out on pathways using phase I enzymes, in which dechlorination occurs through oxidation and/or reduction

reactions catalyzed by enzymes such as P450 monooxygenases [21, 27], peroxidases [28, 29], reductases [30] or dehalogenases [31]. The major metabolites obtained were chlorophenols, which seemed to be managed by conjugation enzymes from phase II [32]. Some studies have shown that chlorophenol detoxification through glutathione conjugation may occur in aquatic plant tissue, with such a reaction being catalyzed by glutathione S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) [33-35]. In addition, Petroutsos et al. [36, 37] have shown that in the alga *Tetraselmis marina*, the detoxification pathway of chlorophenols involves glucoconjugation, catalyzed by UDP-glucosyltransferases (UGT, EC 2.4.1).

The aim of the present study was to quantify the effects of sublethal concentrations of OCs on the plant detoxification system. To this end, a plant that is typically used in phytoremediation was selected, *Phragmites australis*. The phase II (GST, UGT) detoxification capabilities of *P. australis* have been investigated in order to (i) quantify the effect of MCB, DCB, TCB and HCH in sublethal single-exposure concentrations and (ii) compare the roles of both enzymes when plants are exposed to mixed pollution.

2 Materials and methods

2.1. Chemicals

The chemicals used in this study were MCB (monochlorobenzene), DCB (1,4-dichlorobenzene), TCB (1,2,4-trichlorobenzene) and HCH (γ -hexachlorocyclohexane), which were purchased from Sigma-Aldrich (Germany) as pure standards (99% purity). MCB was provided directly solubilised in methanol.

2.2 Plant material

Phragmites australis plants were purchased from La ferme de Chosal (Annecy, France). The plants were nursery grown and delivered in 10 x10 cm containers. Plants were washed to eliminate soil and were then grown hydroponically (Hoagland nutritive solution replaced every week). After at least 3 weeks of cultivation under controlled conditions (16:8h light:dark; $70 \pm 5\%$ relative humidity; $25 \pm 2^\circ\text{C}$; $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation), plants showing healthy growth were selected for further experimentation. Plants were exposed to media containing MCB, DCB, TCB and HCH. The OC concentrations were selected on the basis of previous experiments [38]. *P. australis* plants were exposed to the No-Observed-Effect Concentration (NOEC) of each congener, i.e., 0.8 mg l^{-1} MCB, 0.8 mg l^{-1} DCB, 10 mg l^{-1} TCB, and 0.7 mg l^{-1} HCH. Secondly, plants were exposed to a mixture of

MCB, DCB, TCB and HCH at the NOEC level (0.2 mg l^{-1} MCB + 0.2 mg l^{-1} DCB + 2.5 mg l^{-1} TCB + 0.175 mg l^{-1} HCH). The exposure time was fixed at 7 days. After this, roots, rhizomes and leaves were taken and frozen immediately in liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C before analysis. For each treatment, three independent replicates were made.

2.3 GST extraction and assay

Frozen plant tissue was homogenized as described previously [39], being frozen with liquid nitrogen, crushed to a fine powder with a mortar and pestle and extracted at 4°C in (1/10; w/v) 0.1 M Tris/HCL buffer pH 7.8, containing 1% soluble PVP (polyvinylpyrrolidone, K30), 1% Nonidet and 5mM EDTA. The crude extract was centrifuged at 20000g and 4°C for 30 min. Proteins in the supernatant were precipitated by stepwise addition of solid ammonium sulphate to 40% saturation, and, in a second step, to 80% saturation. After each step, the extracts were centrifuged at 20,000g and the pellets were resuspended in 2.5 ml of 20 mM Tris/HCL buffer, pH 7.8. The extracts were desalted and further purified by passing through gel-filtration columns (PD 10, GE Healthcare, Freiburg).

The GST assays were performed as described by Schroeder et al. [40], using the standard substrates 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB, $\epsilon_{345} = 8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 4-nitrobenzyl chloride (NBC, $\epsilon_{310} = 1.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), *p*-nitrobenzoyl chloride (NBOC, $\epsilon_{310} = 1.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and fluorodifen ($\epsilon_{400} = 3.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.4 UGT extraction and assay

Frozen plant tissue was crushed as described above, using 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5, containing 1% soluble PVP K90, 2 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA and 1 mM PMSF (1/10; w/v). The crude extract was centrifuged at 15,000g and 4°C for 30 min. Proteins in the supernatant were precipitated by stepwise addition of solid ammonium sulphate to 40%, and, in a second step, to 75% saturation. After this, extracts were centrifuged at 18500g and the pellets were dissolved in 2.5 ml 0.2 M Tris/HCL pH 7.3. After desalting as described above, 2 mM MgCl_2 was added to the purified extracts.

UGT assays were performed using 200 mM Tris/HCL, pH 7.3, 2 mM MgCl_2 , 20 mM UDPG (Uridine-diphosphate glucose), 25 mM 4-NPG (4-nitrophenyl β -D-glucuronide), 25 mM Salicin and the enzyme extract. 2,4,5-TCP (2,4,5-trichlorophenol, 2 mM) was used as a substrate for an assay of O-Glucosyltransferase activity. The mix was incubated at 30°C in a

water bath for 60 min, and the reaction was stopped by precipitation of the protein using 10 µl concentrated phosphoric acid. After centrifugation, the supernatant was diluted 1:4 (v/v) with HPLC-Solvent A (99.9% H₂O/0.1% TFA(Trifluoroacetic acid)). HPLC analysis was carried out using an HPLC system (Bischoff Chromatography, Germany) equipped with a C18 ProntoSIL Spheribond ODS 2 reverse-phase column (5.0 µM; Dimension SC-04, 125 x4 mm). The injector was used in split mode, with an injection volume of 30µl. The solvent HPLC-gradient is described in Table 1 and the flow rate was 1 ml min⁻¹. Under these conditions, the retention time (Tr) of 2,4,5-TCP was 14.28 min and the Tr of the conjugate was 9.49 min. A calibration curve was established for 2,4,5-TCP, beginning at the highest concentration of substrate in the enzyme assay.

The protein content of the samples was measured using the method described by Bradford (1976), with bovine serum albumin being used as the standard protein.

Table 1: Solvent HPLC-Gradient

Time (min:sec)	Solvent B as a % (water/0.1% TFA)	Solvent A as a % (Acetonitril/0.1% TFA)
0	8	92
12	100	0
14:15	100	0
16:15	8	92
20	8	92

TFA: Trifluoroacetic acid

3 Results

3.1 Effect of OC single-exposure on enzyme activities

GST activity was measured using various model substrates such as CDNB, DCNB, NBOC, NBC and fluorodifen, in order to examine the specificities and isoenzyme patterns of these different substrates (Pflugmacher et al., 1999). The highest basal conjugation activity values measured in these substrates were those for CDNB and fluorodifen (Table 2). There was a difference in the level of conjugation of CDNB (ANOVA, F20.37, p< 0.0001) and NBC (ANOVA, F3.04, p = 0.05) between the organs of *P. australis*, with the activity levels increasing as follows: roots<rhizomes<leaves. The other GST substrates showed a similar level of activity in all organs. No NBOC conjugation was detected at basal level in any of the organs of *P. australis*.

Table 2 : GSTs activities measured in roots, rhizomes and leaves of *P. australis* exposed during 7 days at MCB, DCB, TCB and HCH NOEC_{7days} (MCB=0.8 mg l⁻¹; DCB=0.8 mg l⁻¹; TCB=10 mg l⁻¹ and HCH=0.7 mg l⁻¹). Corresponding values \pm ES (n=3). *, p<0.05**, p<0.01***, p<0.001 (Mann-Whitney)

		GST activity (μ kat g ⁻¹ protein)		
		Roots	Rhizomes	leaves
Control	CDNB	1.11 \pm 0.19	2.52 \pm 0.50	3.96 \pm 0.48
	DCNB	0.004 \pm 0.003	0.004 \pm 0.002	0.006 \pm 0.003
	NBoC	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.02
	NBC	0.07 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.33 \pm 0.08
	Fluorodifen	1.34 \pm 0.16	1.55 \pm 0.18	1.42 \pm 0.13
MCB	CDNB	0.74 \pm 0.31	2.92 \pm 0.40	2.98 \pm 0.30*
	DCNB	0.011 \pm 0.005	0.009 \pm 0.005	0.010 \pm 0.002*
	NBoC	0.00 \pm 0.18	0.00 \pm 0.03	0.00 \pm 0.03
	NBC	0.05 \pm 0.03	0.25 \pm 0.06	0.23 \pm 0.01
	Fluorodifen	1.51 \pm 0.14	1.37 \pm 0.07	1.45 \pm 0.04
DCB	CDNB	1.04 \pm 0.40	1.19 \pm 0.41	3.14 \pm 0.29
	DCNB	0.004 \pm 0.003	0.005 \pm 0.004	0.000 \pm 0.000
	NBoC	0.00 \pm 0.03	0.002 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02***
	NBC	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.24 \pm 0.07
	Fluorodifen	0.65 \pm 0.04**	0.64 \pm 0.02**	0.70 \pm 0.04**
TCB	CDNB	1.12 \pm 0.10	3.62 \pm 0.20	3.79 \pm 0.06
	DCNB	0.014 \pm 0.005	0.009 \pm 0.001	0.013 \pm 0.003
	NBoC	0.00 \pm 0.06	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.003***
	NBC	0.12 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.43 \pm 0.16
	Fluorodifen	0.64 \pm 0.02**	0.66 \pm 0.02**	0.65 \pm 0.02**
HCH	CDNB	0.41 \pm 0.09 *	1.48 \pm 0.06	3.08 \pm 0.77
	DCNB	0.016 \pm 0.002	0.009 \pm 0.001	0.018 \pm 0.011*
	NBoC	0.07 \pm 0.03**	0.00 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02***
	NBC	0.06 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
	Fluorodifen	0.70 \pm 0.03**	0.60 \pm 0.07**	0.67 \pm 0.01**

Plants exposed to each OC congener showed GST activities towards the five model substrates. GST activity towards NBC remained unaffected compared to unexposed plants, irrespective of the *P. australis* organ and the organochlorine exposure (Table 2). For the other substrates, conjugation activities were either inhibited or induced, depending on the organ and on the OC congener to which it was exposed. GST conjugation for fluorodifen was depressed by 50% in roots, rhizomes and leaves of plants exposed to DCB, TCB and HCH. This decrease was not detected when plants were exposed to MCB. CDNB-GST conjugation remained unaffected under most conditions, with the exception of HCH exposure in roots and MCB exposure in leaves, where significant decreases were obtained, 63% and 25%, respectively. Little induction of GST activity was noted in roots and rhizomes, the exception being a 7-fold induction of NBOC-GST in roots exposed to HCH. In leaves, DCNB-GST and NBOC-GST activities were induced by exposure to all OCs, 3-fold and 3 to 5-fold, respectively.

There were differences between UGT activities in the different *P. australis* organs (ANOVA, F4.96, P = 0.013), with activities increasing as follows: leaves ≤ roots < rhizomes (**Fig1**). None of the OC exposures caused modifications in UGT activity in leaves. Interestingly, UGT activity values were modified in opposite ways between roots and rhizomes. After exposure to DCB and HCH, UGT activity was depressed in roots (by 60% and 40%, respectively) while it was induced in rhizomes (by 65% for both). Exposure to TCB induced UGT activity in roots (by 40%) whereas exposure to MCB did not, and both compounds depressed this activity in rhizomes (by 35% and 50%, respectively).

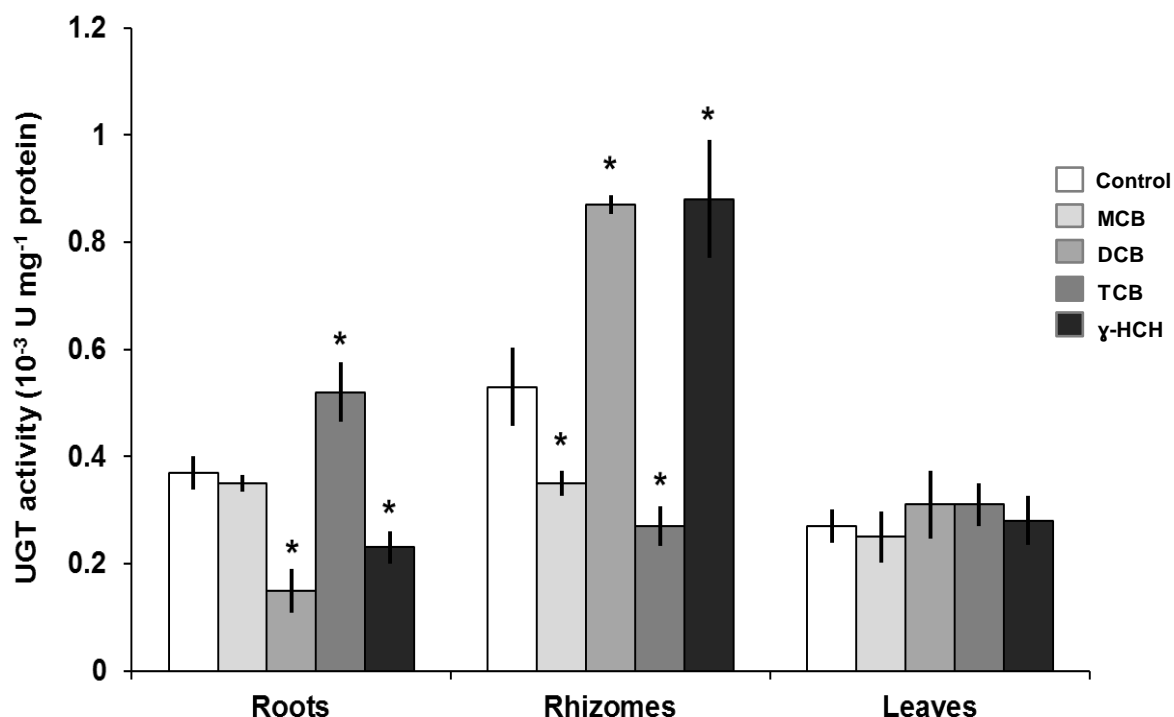


Figure 1 :UGTs activities measured in each compartment : roots, rhizomes and leaves of *P. australis* exposed during 7 days at MCB, DCB, TCB and HCH NOEC_{7days} (MCB=0.8 mg l⁻¹; DCB=0.8 mg l⁻¹; TCB=10 mg l⁻¹ and HCH=0.7 mg l⁻¹). Corresponding values \pm ES (n=3).*,p<0.05 (Mann-Whitney)

3.2 Effect of a mixture of OCs on enzyme activities

The mixture of OCs (0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ HCH), that did not cause phytotoxicity for an exposure of 7 days, partially modified phase II enzyme activities (**Fig 2**). Fluorodifen-GST activity was significantly depressed (40 %) in all organs. GST-DCNB activity was drastically inhibited in roots and leaves, leading to an almost undetectable level of activity. In addition, GST-NBC activity was significantly depressed in rhizomes (75%). Other GST (CDNB 35% non-significant induction, NBOC) activities were similar to the controls in all organs. In roots, UGT activity was not modified by OC mixture exposure, while these enzymes showed depletion (75%) in rhizomes and induction (118%) in leaves.

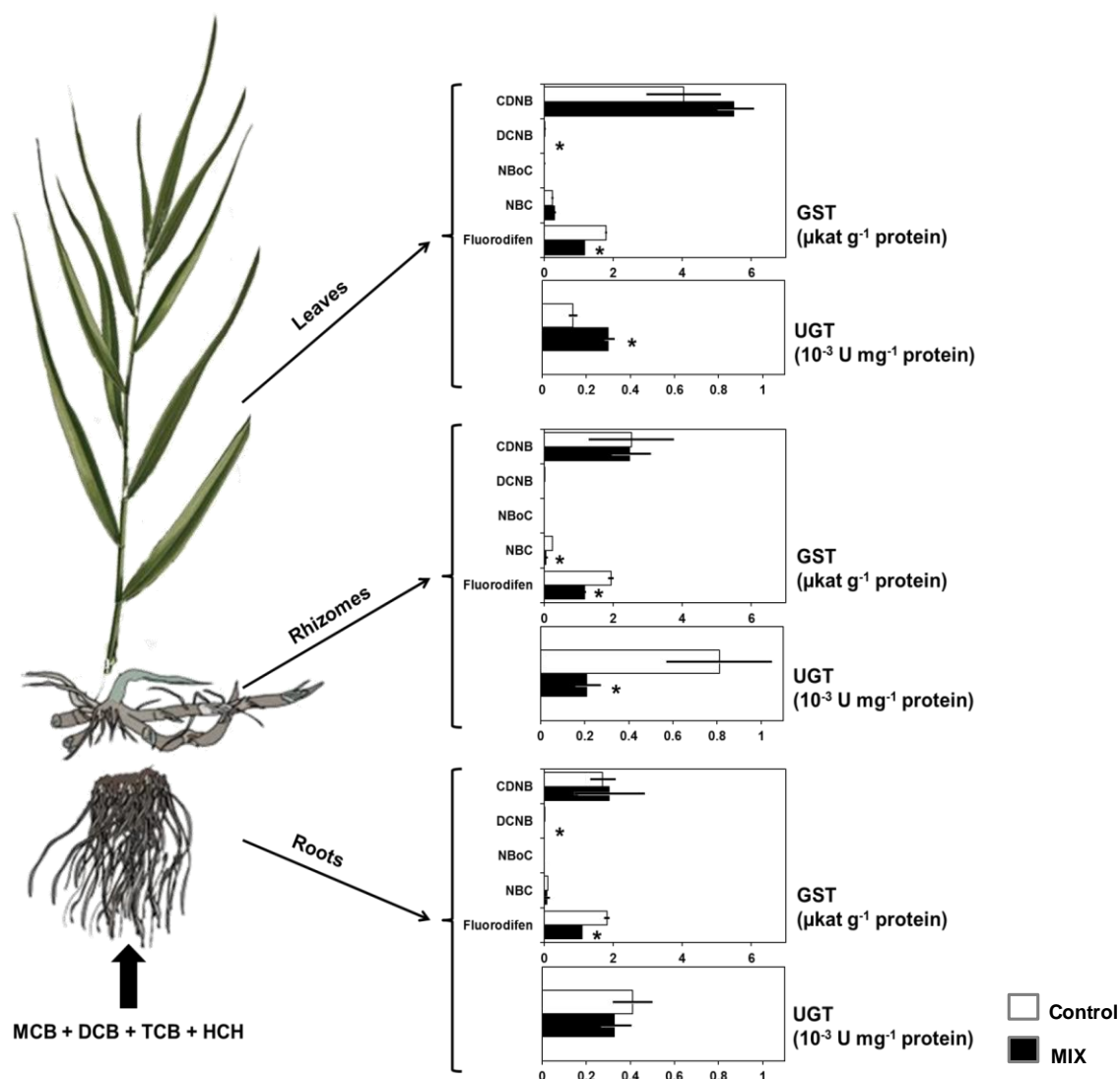


Figure 2 : GSTs and UGTs activities in plant tissues (roots, rhizomes and leaves) of *P. australis* after 7 days of exposure to the mixture of OCs (0.2 mg l^{-1} MCB + 0.2 mg l^{-1} DCB + 2.5 mg l^{-1} TCB + 0.175 mg l^{-1} HCH). Corresponding values \pm ES ($n = 3$). *, $P < 0.05$ (Mann-Whitney).

4 Discussion

The common reed (*Phragmites australis*), one of the most abundant plants to be found in constructed wetlands, was investigated to see whether there are differences in phase II detoxification enzyme activities in different organs. In this study, *P. australis* plants were standardized by being grown under controlled conditions, in order to obtain plants in a similar physiological state for experiments. CDNB is usually used as standard substrate for GST, but it has been shown that using this substrate alone does not give a complete view of GST reactions in plant tissues [40]. We therefore used the following compounds, DCNB, NBC, NBOC and fluorodifen, as additional substrates for the GST superenzyme family [40-42]. The

measured GST activities of roots, rhizomes and leaves were of the same order as those measured directly by Pflugmacher et al. [32] in plants collected from wetlands. As with *in situ* plants, the activities measured with DCNB and fluorodifen were similar for all organs. Nevertheless, our standardized plants showed CDNB-GST and NBC-GST activities that increased as follows: roots<rhizomes<leaves. This was not the case for the *in situ* plants [32]. The same basal GST activity pattern has been observed previously in standardized *Typha latifolia* plants [43]. There were significant differences in UGT activities in different organs, the greatest activity being measured in rhizomes. In conclusion, the roots did not show the greatest GST and UGT activities whereas in leaves there was a high level of GST activity. Rhizomes exhibited an effective detoxification capacity, with relatively high basal GST and UGT activities.

The fact that *P. australis* grows in constructed wetlands contaminated with chlorinated organic compounds indicates that this plant might be tolerant against organochlorines (OCs) [16, 25, 44, 45]. It has been shown that *P. australis* plants are able to phytoextract OCs in a significant manner and that the plants mainly accumulate these pollutants in the roots and rhizomes [22, 23, 45]. Hence, it was essential to investigate detoxification pathway responses to OC exposure in different plant organs, given their differences in OC content. The plants were first exposed to each chlorinated congener individually. The effects of OC exposure on GST activity levels seemed to be correlated to the degree of chlorination. Depletion of fluorodifen-GST and CDNB-GST and induction of NBOC-GST and DCNB-GST were observed, with the observed effects being as follows: MCB<DCB<TCB<HCH. The same correlation between the degree of chlorination of the organic compounds and the ROS/antioxidant enzymes has been shown previously [46-48]. GST induction may be linked directly to the conjugation of chlorinated compounds with GSH, as described previously [37, 49-51]. The measured increases in NBOC-GST and DCNB-GST may therefore be linked to the detoxification of OCs by the conjugation process. Further experiments need to be conducted *in vitro* in order to test this hypothesis. CDNB-GST and fluorodifen-GST activities, however, were inhibited (60% and 50%, respectively, for HCH exposure). The levels of GST inhibition recorded in these experiments have raised further questions about the scenario of this effect at the transcription level or at the enzymes catalysis level. According to Lyubenova et al. [42] metals are able to inhibit GST activity. Thus it is possible that the Cl atoms that are liberated after detoxification may interfere with some of the GST isoforms. The maximum effect on GST activity was obtained in the leaves of plants exposed to HCH. These

results suggest that *P. australis* contains several GST-isoenzymes, the activity of which can be selectively stimulated or inhibited by chlorinated organic compounds. For UGT activities, no correlation has been observed between enzyme activities and the degree of chlorination of the organic compounds. The greatest effects were obtained in roots and rhizomes, while in leaves UGT activity levels were not disturbed. There appeared to be an inverse relationship between the UGT activities found in roots and rhizomes; when the root UGT activity was stimulated by OC exposure, the rhizome UGT activity was decreased, and, inversely, when root UGT activity was decreased, rhizome UGT activity was stimulated. This relationship appears to be complementary from one organ to another. It cannot be determined from this study whether GST and UGT activities increase or decrease in response to the initial OC congener or to metabolites formed *in vivo* during the treatment. Overall, in plants, a chronology-dependent detoxification scenario may be proposed: firstly, in roots and rhizomes, the UGT enzymes might be involved in the conjugation of OCs or their metabolites and secondly, in leaves, the GST enzymes may complete the detoxification process.

In the field, contamination often involves a mixture of pollutants that may be assumed to undergo even more complex reactions [40]. OCs are rarely detected as single compounds in environmental samples, in which numerous chlorinated compounds have been collected from soils, sediments and water [6, 12, 52]. Complex mixtures of organic pollutants have the potential for additive, synergistic or antagonistic interactions [53]. In this study, the OC mixture causing no observed effects on *P. australis* for a short exposure time of 7 days was made up of 0.2 mg l^{-1} MCB + 0.2 mg l^{-1} DCB + 2.5 mg l^{-1} TCB + 0.175 mg l^{-1} HCH [26]. This OC mixture only caused depletion of all GST isoenzyme activity. We expected CDNB-GST activity to be induced in leaves, but only a potential induction (35%) was measured, without statistical significance ($p = 0.275$). In the case of UGT activities, depletion (73%) was measured in rhizomes and induction (118%) was measured in leaves. The hypothetical scenario given above does not appear to apply for exposure to mixed pollutants. These results have raised further hypotheses about the time scale of the overall process and interactions within the process. Firstly, GST and UGT activity is affected by OC exposure, but the response may differ according to the exposure time. This hypothesis is possibly strengthened by the findings of previous studies on antioxidant enzymes in which GR activities in leaves were induced by 3 days of exposure to an OC mixture while these activities decreased after 7 days exposure [26]. Detoxification enzyme activities might therefore be time dependent. Secondly, the OC mixture and/or the OC metabolites and/or Cl atoms may inhibit GST

activity, leading to the depletion of fluorodifen-, DCNB- and NBC-GST activities. The inhibition of GST enzymes has been already demonstrated in the presence of heavy metals and organic compounds [41, 54, 55]. The observed inhibition seemed to correspond to the additive or synergistic effect of the OC mixture when the stress factors, such as total Cl^- and free radicals, were increased [26, 41]. Thirdly, the depletion of GST and UGT activities might be linked to the internal OC doses. A dose-response characterized by a low-dose stimulation and a high-dose inhibition is called hormesis. This phenomenon has been reported in different plants that have been exposed to chlorinated aromatic hydrocarbons [21, 26, 34, 48, 56]. Further experiments need to be conducted (i) to test GST and UGT activities as a function of exposure time in different organs and (ii) to test enzyme activities *in vitro* and in the presence of OCs, in order to characterize the inhibition effect (direct inhibition of enzymes by organic compounds and/or Cl^- , or the effect at the transcriptional level).

5 Conclusions

The concept of using constructed wetlands for the treatment of several kinds of industrial wastewater has received a great deal of attention, the aim being to eliminate recalcitrant organic substances. Specific studies using pilot-scale constructed wetlands that have been unplanted and then planted with *Phragmites* spp. have shown that the removal of chlorobenzenes was more effective in the planted pilot, indicating the enhancement of contaminant removal by plants [22, 25, 57]. In areas close to industrial sources, the maximum environmental concentrations in surface waters have been shown to be as high as 0.2 mg l^{-1} of OCs [14]. In this study, the $\text{NOEC}_{7\text{days}}$ mixed pollution that was tested was 15 times higher than the maximum contamination of surface waters. Our findings with respect to GST and UGT activities show that OCs may be buffered by glutathione and glucose conjugation. *P. australis* plants that have been exposed to an OC mixture show induction of some GST isoenzymes (CDNB, not significant) and UGT in leaves. UGTs appear to be key enzymes in the detoxification of OCs. Thus this plant's high tolerance to OCs, linked to its detoxification efficiency, is a prerequisite to its being successfully applied in phytoremediation technologies.

Acknowledgements

This work is part of VALORSITE-PHYCO project funded by AXELERA and supported by COST Action 859 for a Short Term Scientific Mission (Helmholtz Zentrum München). We are especially grateful to Martha and John Willison for improving the English text.

References

1. Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian CG, Schaffer A, Weber R (2011): Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 152-162
2. El-Shahawi MS, Hamza A, Bashammakh AS, Al-Saggaf WT (2010): An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80, 1587-1597
3. Miglioranza KSB, Sagrario M, de Moreno JEA, Moreno VJ, Escalante AH, Osterrieth ML (2002): Agricultural soil as a potential source of input of organochlorine pesticides into a nearby pond. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 250-256
4. Abhilash PC, Singh N (2010): Effect of growing *Sesamum indicum* L. on enhanced dissipation of lindane (1, 2, 3, 4, 5, 6-hexachlorocyclohexane) from soil. *Int. J. Phytoremediat.* 12, 440-453
5. Marvin C, Painter S, Williams D, Richardson V, Rossmann R, Van Hoof P (2004): Spatial and temporal trends in surface water and sediment contamination in the Laurentian Great Lakes. *Environ. Pollut.* 129, 131-144
6. Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, Raina V, Kohler HPE, Holliger C, Jackson C, Oakeshott JG (2010): Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 58-80
7. Sun JH, Feng JL, Liu Q, Li QL (2010): Distribution and sources of organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from upper reach of Huaihe River, East China. *J. Hazard. Mater.* 184, 141-146
8. Turgut C, Atatanir L, Cutright TJ (2010): Evaluation of pesticide contamination in Dilek National Park, Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 170, 671-679
9. Ricking M, Schwarzbauer J (2008): HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin, Germany. *Environ. Chem. Lett.* 6, 83-89
10. Fathepure BZ, Tiedje JM, Boyd SA (1988): Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to trichlorobenzenes and dichlorobenzenes in anaerobic sewage-sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 327-330
11. Adrian L, Szewzyk U, Wecke J, Gorisch H (2000): Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408, 580-583
12. Meharg AA, Wright J, Osborn D (2000): Chlorobenzenes in rivers draining industrial catchments. *Sci. Total Environ.* 251, 243-253
13. Lee CL, Song HJ, Fang MD (2000): Concentrations of chlorobenzenes, hexachlorobutadiene and heavy metals in surficial sediments of Kaohsiung coast, Taiwan. *Chemosphere* 41, 889-899
14. Malcolm HM, Howe PD, Dobson S (2004): Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene: Environmental aspects. World Health Organization, Concise International Chemical Assessment Document 60
15. Chopra AK, Sharma MK, Chamoli S (2011): Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system-an overview. *Environ. Monit. Assess.* 173, 905-916
16. Ma XM, Burken JG (2002): VOCs fate and partitioning in vegetation: Use of tree cores in groundwater analysis. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4663-4668
17. Sinha S (2002): Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46, 281-288

18. Miglioranza KSB, de Moreno JEA, Moreno VJ (2004): Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water Res.* 38, 1765-1772
19. Zhang JY, Zhao W, Pan J, Qiu LM, Zhu YM (2005): Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environ. Int.* 31, 855-860
20. Gomez-Hermosillo C, Pardue JH, Reible DD (2006): Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3229-3236
21. Monferran MV, Wunderlin DA, Nimptsch J, Pflugmacher S (2007): Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68, 2073-2079
22. Ma XM, Havelka MM (2009): Phytotoxicity of Chlorinated Benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environ. Toxicol.* 24, 43-48
23. San Miguel A, Ravanel P, Raveton M (in prep): A comparative study of the uptake and translocation of organochlorines by *Phragmites australis*.
24. Kaschl A, Schultz A, Vogt C, Dorusch F, Popp P, Borsdorf H, Kuster E, Kusch P, Kastner M, Weiss H (2005): A meso-scale constructed wetland for the remediation of chlorobenzene contaminated groundwater. In: Thomson NR (Editor), *Bringing Groundwater Quality Research to the Watershed Scale*. Iahs Publication. Int Assoc Hydrological Sciences, Wallingford, pp. 404-411
25. Braeckevelt M, Mirschel G, Wiessner A, Rueckert M, Reiche N, Vogt C, Schultz A, Paschke H, Kusch P, Kaestner M (2008): Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecol. Eng.* 33, 45-53
26. Faure M, San Miguel A, Ravanel P, Raveton M (in prep): Dose responses to organochlorines in *Phragmites australis*.
27. Hatzios KK, Burgos N (2004): Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Sci.* 52, 454-467
28. Jansen MAK, Hill LM, Thorneley RNF (2004): A novel stress-acclimation response in *Spirodela punctata* (Lemnaceae): 2,4,6-trichlorophenol triggers an increase in the level of an extracellular peroxidase, capable of the oxidative dechlorination of this xenobiotic pollutant. *Plant Cell Environ.* 27, 603-613
29. Biswas DK, Scannell G, Akhmetov N, Fitzpatrick D, Jansen MAK (2010): 2,4,6-Trichlorophenol mediated increases in extracellular peroxidase activity in three species of *Lemnaceae*. *Aquat. Toxicol.* 100, 289-294
30. Magee KD, Michael A, Ullah H, Dutta SK (2008): Dechlorination of PCB in the presence of plant nitrate reductase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 144-147
31. Susarla, S., Medina V. F., et al. (2002): Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* 18, 647-658.
32. Pflugmacher S, Geissler K, Steinberg C (1999): Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in different cormus parts of *Phragmites australis*. *Ecotox. Environ. Safe.* 42, 62-66
33. Pflugmacher S, Schröder P (1995): Glutathion S-transferases in trees: Inducibility by various organic xenobiotics. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 158, 71-73
34. Menone ML, Pflugmacher S (2005): Effects of 3-chlorobiphenyl on photosynthetic oxygen production, glutathione content and detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Chemosphere* 60, 79-84
35. Michalowicz J, Urbanek H, Bukowska B, Duda W (2010): The effect of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol on antioxidant system in the leaves of *Phalaris arudinacea*. *Biol. Plant.* 54, 597-600
36. Petroutsos, D., J. Wang, et al. (2007). "Toxicity and metabolism of p-chlorophenol in the marine microalga *Tetraselmis marina*." *Aquat. Toxicol.* 85, 192-201.
37. Petroutsos D, Katapodis P, Samiotaki M, Panavotou G, Kekos D (2008): Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69, 707-714
38. Faure M, San Miguel A, Ravanel P, Raveton M (submitted): Dose responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Chemosphere*

39. Schroeder P, Meier H, Debus R (2005): Detoxification of herbicides in *Phragmites australis*. Zeitschrift Naturforsch 60c, 317-324
40. Lyubenova L, Schröder P (2011): Plants for waste water treatment - Effects of heavy metals on the detoxification system of *Typha latifolia*. Bioresour. Technol. 102, 996-1004
41. Schröder P, Scheer CE, Diekmann F, Stampfl A (2007): How plants cope with foreign compounds - Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). Environ. Sci. Pollut. Res. 14, 114-122
42. Lyubenova L, Gotz C, Golan-Goldhirsh A, Schröder P (2007): Direct effect of Cd on glutathione s-transferase and glutathione reductase from *Calystegia sepium*. Int. J. Phytoremediat. 9, 465-473
43. Schröder, P., L. Lyubenova, et al. (2009): Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plants? Environ. sci. pollut. res. int. 16, 795-804.
44. Tawney I, Becker JG, Baldwin AH (2008): A novel dual-compartment, continuous-flow wetland microcosm to assess cis-dichloroethene removal from the rhizosphere. Int. J. Phytoremediat. 10, 455-471
45. Imfeld G, Braeckevelt M, Kusch P, Richnow HH (2009): Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. Chemosphere 74, 349-362
46. Kong FX, Hu W, Liu Y (1998): Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. Environ. Exp. Bot. 40, 105-111
47. Liu H, Weisman D, Ye YB, Cui B, Huang YH, Colon-Carmona A, Wang ZH (2009): An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 176, 375-382
48. San Miguel A, Faure M, Ravanel P, Raveton M (accepted): Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of mono-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes. Ecotoxicology
49. Cherifi M, Raveton M, Picciocchi A, Ravanel P, Tissut M (2001): Atrazine metabolism in corn seedlings. Plant Physiol. Biochem. 39, 665-672
50. Marcacci S, Raveton M, Ravanel P, Schwitzguebel JP (2006): Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. Environ. Exp. Bot. 56, 205-215
51. Bakkali Y, Ruiz-Santaella JP, Osuna MD, Wagner J, Fischer AJ, De Prado R (2007): Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): Mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. J. Agric. Food Chem. 55, 4052-4058
52. Feidieker D, Kampfer P, Dott W (1995): Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic-compounds and HCH in the subsurface environment J. Contam. Hydrol. 19, 145-169
53. Hertzberg RC, MacDonell MM (2002): Synergy and other ineffective mixture risk definitions. Sci. Total Environ. 288, 31-42
54. Iverson CD, Zahid S, Li YM, Shoaqafi AH, Ata A, Samarasekera R (2010): Glutathione S-transferase inhibitory, free radical scavenging, and anti-leishmanial activities of chemical constituents of *Artocarpus nobilis* and *Matricaria chamomilla*. Phytochem. Lett. 3, 207-211
55. Vernouillet G, Eullaffroy P, Lajeunesse A, Blaise C, Gagne F, Juneau P (2010): Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. Chemosphere 80, 1062-1068
56. Calabrese EJ, Baldwin LA (2002): Hormesis and high-risk groups. Regul. Toxicol. Pharmacol. 35, 414-428
57. Cottin N, Merlin G (2010): Fate of Chlorinated Benzenes in Laboratory Peat and Pozzolana Filters. Water Air Soil Pollut. 213, 425-435

Chapitre IV

Etude des communautés bactériennes de la rhizosphère

I. Problématique et démarche de l'étude

1. Contexte général

La rhizosphère décrite comme 'le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire' (Darrah, 1993) est un lieu propice d'interactions entre polluants-microflore-plante. Ces interactions sont complexes avec des évolutions temporelles dépendants des facteurs abiotiques et biotiques environnants. Ainsi, les processus de colonisation et d'extinction d'espèces soumises à un stress chimique peuvent correspondre à une succession dont la trajectoire dépend de la nature de la perturbation chimique, des espèces végétales présentes, des espèces microbiennes amenées à coloniser le milieu et/ou déjà présentes dans ce milieu sous forme latente, ainsi que des conditions climatiques.

Actuellement, peu d'études ont abordé cette problématique d'écotoxicologie microbienne de la rhizosphère. La biodégradation des polluants au niveau rhizosphérique de plantes aquatiques (*P. australis*) a été abordée lors d'études concernant les contaminations par des molécules organiques telles que les HAPs, ou encore certains COVs (composés organiques volatiles) (Jouanneau et al., 2005 ; Tadashi et al., 2010 ; Braeckevelt et al., 2011). La dégradation microbienne par oxydation et/ou réduction sont des processus considérés comme majeurs en bioremédiation et recherchés pour la décontamination de produits chimiques dangereux pour l'environnement. La rhizosphère des hélophytes est connue pour présenter des conditions favorables au développement et à la diversité microbienne, dont les activités enzymatiques conduisent à une dégradation potentiellement élevée des contaminants organiques (Walton and Anderson 1990), (Stottmeister et al. 2003).

La dynamique des communautés microbiennes exposées à une pression chimique pourrait être expliquée par l'opportunisme écologique de certaines espèces adaptée à cette pression de sélection (Rainey et al. 2005). Aussi, nous avons étudié la microflore rhizosphérique des macrophytes (*Phragmites australis*) cultivés en présence ou en absence de pollution mixte aux OCs. Les objectifs principaux de notre étude concernaient (i) l'évaluation de l'impact des OCs sur les communautés bactériennes et

fongiques, (ii) l'adaptation de certaines espèces microbiennes à la pression chimique et (iii) la tolérance/sensibilité des espèces bactériennes cultivables aux OCs.

2. Approche expérimentale

Les macrophytes *P. australis* ont été cultivés en conditions contrôlées ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$; PAR) sur un support organique (Tourbe) pendant 1 mois. Les plantes (cultivées en pot) présentant un développement physiologique optimal ont été exposées à un mélange d'OCs (1.4 mg/l ΣHCH , 1 mg/l MCB, 1.5 mg/l ΣDCB , 15 mg/l ΣTCB) préparés selon Cottin et Merlin (2010). L'effet dose des OCs sur la rhizosphère a été étudié en diluant la solution initiale (facteur de dilution : 2 pour le pot 2, et 20 pour le pot 3).

Au cours de l'exposition, des prélèvements de la rhizosphère ont eu lieu à 15 et 45 jours d'exposition. Sur ces échantillons, des isollements bactériens ont été réalisés et l'identification de chacune des souches a été réalisée par comparaison à des séquences ARNr 16S (**Fig 56**). Par ailleurs, la structure des communautés bactériennes de la rhizosphère a été analysée pour chaque condition d'exposition par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) et par pyroséquençage 454.

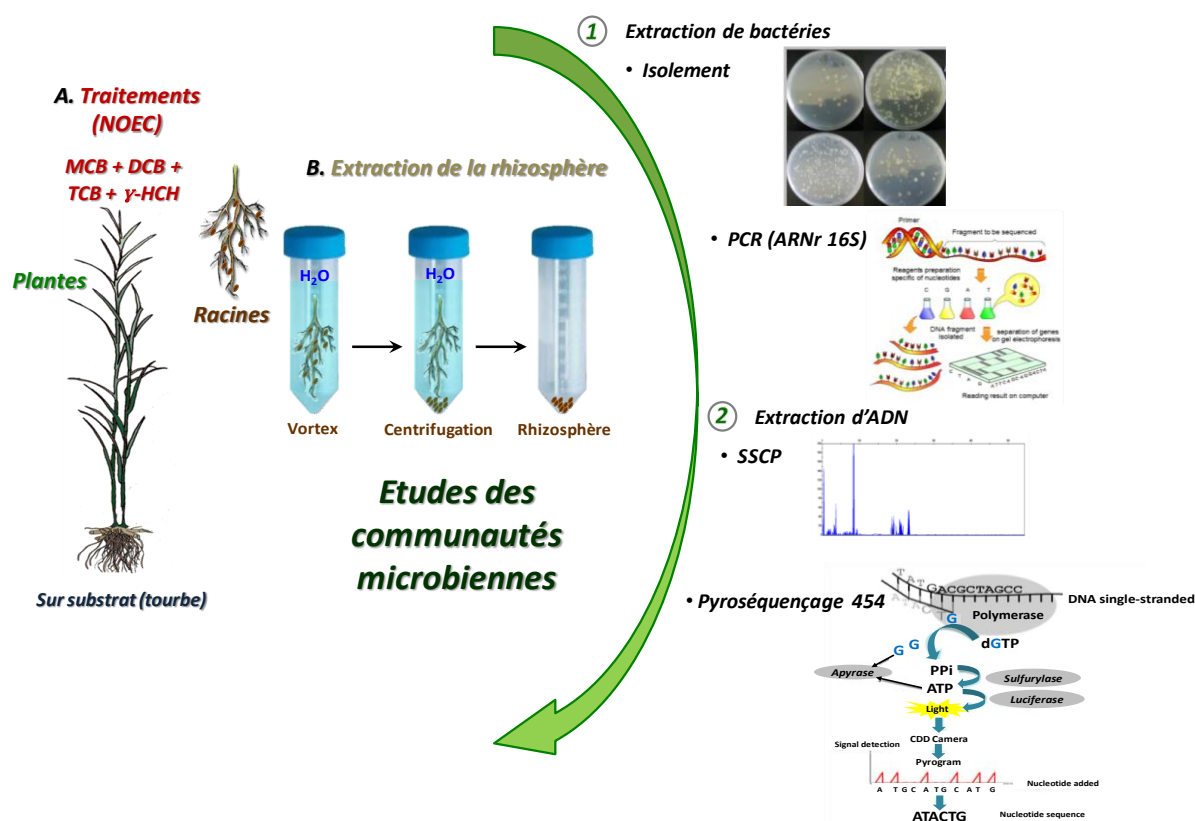


Figure 56 : Méthodologies et techniques d'analyses des communautés bactériennes de la rhizosphère. Protocole ①② : **Publications 5**
 SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism
 PCR : Polymerase Chain Reaction

II. Résultats et discussion

1. Dynamique des communautés microbiennes de la rhizosphère sous pression chimique

Dans une première approche, la structure des communautés bactériennes et fongiques en présence et en absence des OCs a été analysée par la méthode SSCP où les profils d'ADN des microorganismes sont statistiquement comparés pour déterminer les divergences (**publication 5**). Les résultats obtenus sur les communautés fongiques ne mettent pas en évidence d'effets significatifs des OCs sur ce type de communauté (**Fig 57a**). Ce même résultat a été observé au niveau de la rhizosphère de *Z. mays* et de *P. australis*. Cependant, l'arbre de distance des communautés bactériennes montre une

corrélation positive entre la pression chimique appliquée et la variation de profil de ces communautés. Chez *Z. mays*, les communautés bactériennes des plantes exposées aux OCs sont significativement différentes des lots témoins (**Fig 57b**). Chez *P. australis*, l'analyse SSCP montre que les communautés bactériennes sont significativement proches entre les échantillons témoin et Pot 3 d'une part et d'autre part entre les échantillons Pot 1 et Pot 2 (**Fig 58**). Ces observations semblent être corrélées à la pression chimique des OCs, les échantillons les plus contaminés montrent des profils d'ADN bactériens statistiquement différents des lots témoins et Pot 3 pour lesquels la perturbation chimique est moins importante.

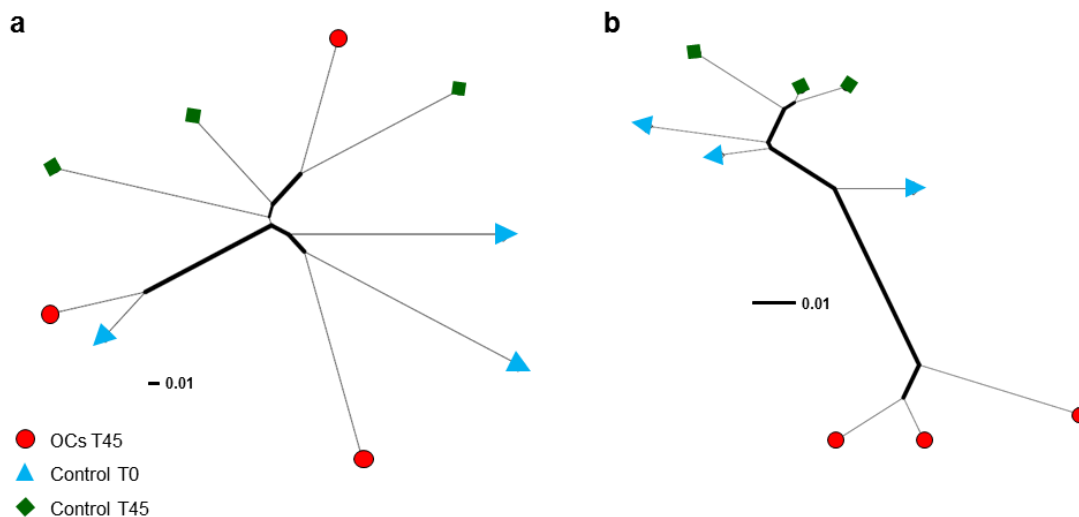


Figure 57 : Variations du profil moléculaire des communautés fongiques (a) et bactériennes (b) de la rhizosphère de *Z. mays* en fonction de la durée d'exposition aux OCs (SSCP). Les lignes épaisses indiquent les branches soutenues par une valeur de bootstrap > 500

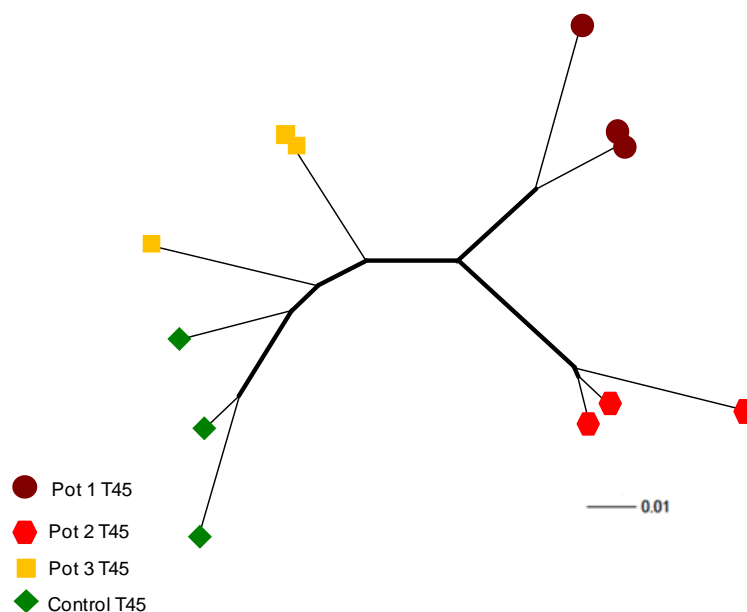


Figure 58 : Variation du profil moléculaire des communautés bactériennes après 45 jours de traitements, évalués par SSCP. Les lignes épaisses indiquent les branches soutenues par une valeur de bootstrap > 500

2. Tolérance des souches bactériennes aux OCs

Les souches isolées à partir de la rhizosphère ont été cultivées sur milieu pauvre LB_{1/10}. Par cette méthode, seules les souches cultivables aérobies ont pu être étudiées. Ces souches bactériennes, identifiées après séquençage ARNr 16S, ont permis d'établir des arbres phylogénétiques en précisant l'origine des bactéries en fonction des conditions d'exposition. Dans le cas de *Z. mays*, la phylogénie montre que peu de souches sont spécifiques des conditions témoins et des conditions traitées aux OCs (**Fig 59**). En effet, la répartition des souches cultivées entre les échantillons semble assez hétérogène parmi les diverses classes et phyla de l'arbre phylogénétique. Dans le cas de *P. australis*, 78 souches ont été isolées, divisées en 5 phyla incluant 3 classes de *Proteobacteria* (*Alpha-* ; *Beta-* ; et *Gamma*) (**Publication 5**). Certaines souches (e.g., *Flavobacteria*, *Sphingobacteria*) sont isolées uniquement à partir des lots de plantes témoin et du Pot3 où la concentration en OCs est la moins importante. Par ailleurs, certaines souches comme les *Firmicutes* (*Exiguobacterium sp.*, *Bacillus sp.* et *Paenibacillus sp.*) sont présentes uniquement dans les lots contenant de fortes doses en OCs. Elles semblent donc tolérantes et adaptées aux conditions les plus contaminées en OCs.

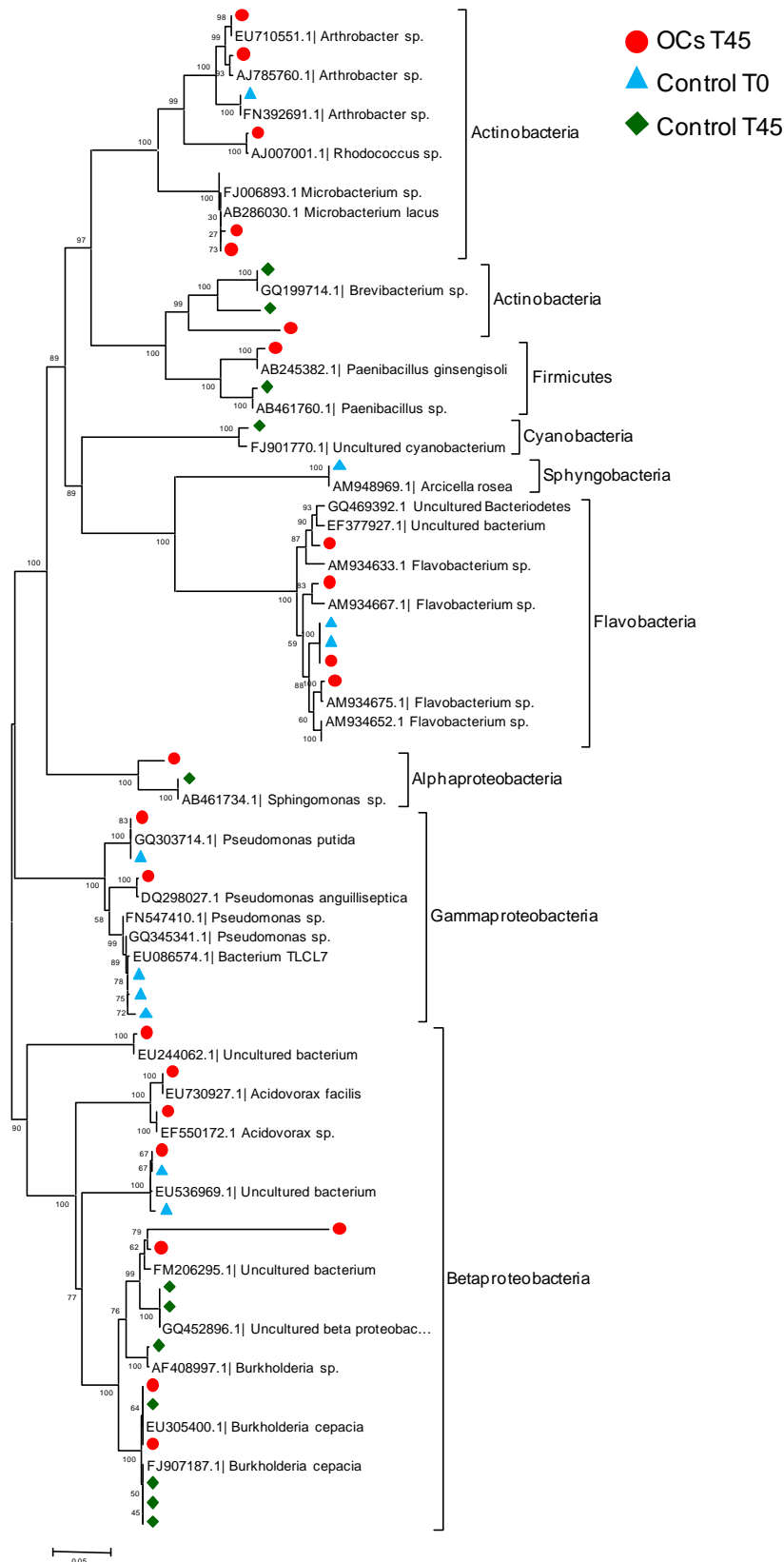


Figure 59 : Dendrogramme phylogénétique des bactéries isolées à partir de la rhizosphère de *Z. mays* sans et avec exposition aux OCs. L'arbre phylogénétique a été réalisé à l'aide de la méthode de "neighbor-joining".

Afin de vérifier ces hypothèses de tolérance et de sensibilité des bactéries aux OCs, des tests de toxicité ont été réalisés en laboratoire avec les souches isolées. Les souches ont été cultivées sur milieu riche gélosé contenant les OCs (mono- et multi-pollution). Nos hypothèses sur la tolérance/sensibilité de certaines souches aux OCs sont confortées par les résultats des tests de toxicité (**Tableaux 15 et 16**). Ainsi, les genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhodococcus* reconnus dans la littérature pour leur capacité à biodégrader les polluants organiques, notamment chlorés (Koch et al. 1991, Whyte et al. 2002, Rapp and Gabriel-Jurgens 2003), sont tolérants aux OCs dans nos tests. Les souches telles que *Exiguobacterium* (Sharma and Rehman 2009) *Paenibacillus* (Oldfield et al. 1998) *Aeromonas* (Mrozik et al. 2003), *Arthrobacter* (Jagnow et al. 1977), *Sphingomonas* (Vidali 2001), également décrites pour être de bons modèles en bioremédiation, ont été testées tolérantes aux OCs. Les souches *Hevizibacter*, *Curtobacterium*, *Frateuria*, *Acidovorax*, *Arcicella* isolées à partir de la rhizosphère des plantes témoins essentiellement sont sensibles à l'ensemble des OCs testés. Seule la souche du genre *Bacterium* semble avoir une certaine tolérance au TCB, DCB et MCB mais reste sensible au γ HCH.

Tableau 15 : Récapitulatif des tests de tolérance sur les souches bactériennes cultivées et issues de la rhizosphère de *Z. mays*.
Les résultats des tests réalisés sur chaque souche identifiée sont résumés par genre car les réponses sont similaires.

Phylum						
Class	Genus	γ -HCH	TCB	DCB	MCB	MIX
Actinobacteria						
Actinobacteridaea	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+
	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+
	<i>Microbacterium</i>	+	+	+	+	+
Proteobacteria						
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+	+
Alphaproteobacteria	<i>Bacterium</i>	-	+	+	+	-
	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	+	+
Firmicutes						
Bacilli	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	+	+

Tableau 16 : Récapitulatif des tests de tolérance sur les souches bactériennes cultivées et issues de la rhizosphère de *P. australis*.
Les résultats des tests réalisés sur chaque souche identifiée sont résumés par genre car les réponses sont similaires.

Phylum							
	Class	Genus	γ -HCH	TCB	DCB	MCB	MIX
Tolerant strains	Actinobacteria						
	Actinobacteridaea	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+
		<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+
	Proteobacteria						
	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	+	+
	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+	+
		<i>Aeromonas</i>	+	+	+	+	+
	Firmicutes						
Sensitive strains	Bacilli	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+
		<i>Exiguobacterium</i>	+	+	+	+	+
	Bacteroidetes						
	Flavobacteria	<i>Hevizibacter</i>	-	-	-	-	-
	Actinobacteria						
	Actinobacteridaea	<i>Curtobacterium</i>	-	-	-	-	-
	Proteobacteria						
	Alphaproteobacteria	<i>Bacterium</i>	-	+	+	+	-
	Gammaproteobacteria	<i>Frateuria</i>	-	-	-	-	-
	Betaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	-	-	-	-	-
	Sphingobacteria	<i>Arcicella</i>	-	-	-	-	-

3. Analyse de la structure des communautés bactériennes par séquençage massif (pyroséquençage 454)

Le suivi des communautés bactériennes (identification, abondance) est complexe à aborder et fait appel à des technologies de biologie moléculaire de pointe (pyroséquençage 454). Ces techniques permettent de séquencer l'ensemble des souches bactériennes (cultivables et non-cultivables, anaérobies et aérobies) et d'obtenir, après traitement des métadonnées par bioinformatique, une analyse qualitative et quantitative des souches.

Dans le cas de *Z. mays*, les résultats de l'analyse NMDS n'ont pas permis de visualiser clairement les différences entre échantillons et aucune logique de répartition n'est observée en fonction du traitement. Le tableau d'abondance (**Fig 60**) ne révèle pas non plus de distinction très nette entre les échantillons témoins et les échantillons contaminés aux OCs. Il semblerait tout de même que la Classe *Alphaproteobacteria* soit la plus abondante dans les échantillons témoin. Parmi cette Classe, le genre *Rhodospirillales* semble statistiquement plus abondant dans les échantillons de rhizosphère traités aux OCs après 45 jours.

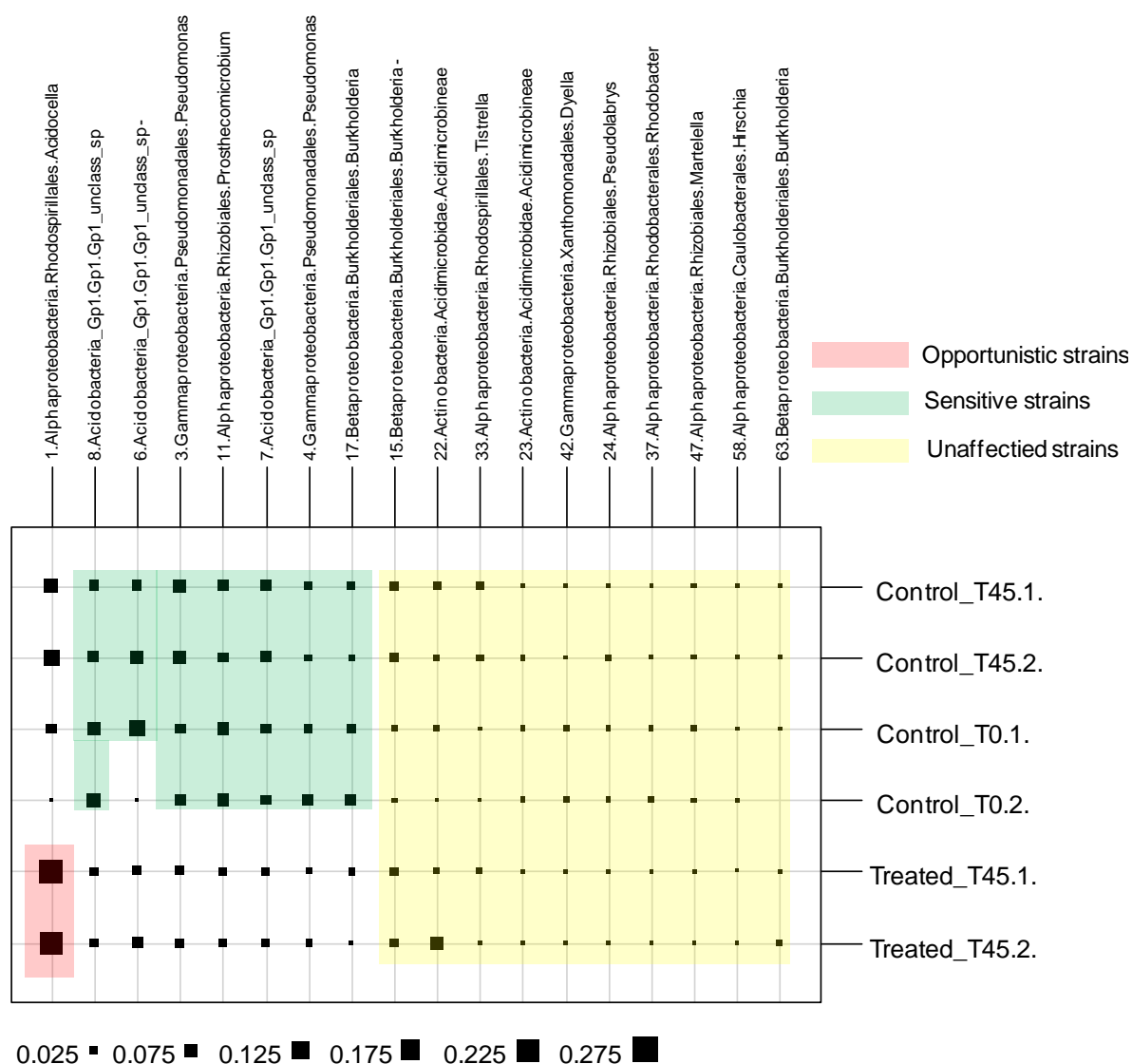


Figure 60 : Distribution spatiale et temporelle des principaux MOTUs issus des échantillons de rhizosphère de *Z. mays*. Les colonnes du diagramme représentent les 36 MOTUs les plus abondants. Les lignes représentent les échantillons. L'échelle de taille indique la fréquence des souches dans chaque échantillon.

Ces résultats préliminaires sur la rhizosphère de *Z. mays*, nous a permis de développer les analyses statistiques sur les échantillons de rhizosphère de *P. australis*. Dans ce dernier cas, les modes d'exposition aux OCs sont progressifs (témoin<Pot3<Pot2<Pot1) et nous ont permis de déterminer la dynamique des communautés microbiennes en fonction du gradient de pression chimique. Les résultats de l'analyse multidimensionnelle non métrique (NMDS) ($r=0,97$; $p<0,001$), ont permis (1) de visualiser les ressemblances entre les différents profils de communautés bactériennes issus des diverses conditions d'exposition et (2) de valider le choix de sélectionner les MOTUs (molecular operational taxonomic units) les plus représentés

dans la rhizosphère (**Publication 5**). Ce travail aura permis d'établir une figure d'abondance (**Fig 61**) des principales classes bactériennes présentes dans la rhizosphère en fonction des expositions aux OCs. Parmi les MOTUs les plus abondants, seulement une faible partie correspond à des souches bactériennes cultivables (17 %) et appartiennent toutes à des groupes tolérants et opportunistes. Les souches précédemment isolées à partir de la rhizosphère ont été identifiées dans le jeu de séquences obtenues par pyroséquençage mais ne font pas partie des MOTUs abondants (≥ 5 fois). C'est le cas du phylum *Firmicutes*, pourtant détecté comme souche opportuniste lors de nos expériences d'isolement. Les suivis des communautés bactériennes montrent une structuration significative des communautés en fonction de l'amplitude de la pression chimique OCs (**Fig 62**). Cette disparité s'exprime par des différences d'abondance de certains groupes bactériens plus ou moins favorisés par l'exposition aux OCs. Certaines souches bactériennes semblent sensibles aux OCs puisque leur abondance diminue (voire une non-détection de ces souches) lorsque la pression chimique OCs est forte. Les *Parvibaculum* sp, *Meganema* sp, *Stella* sp, *Filomicrobium* sp, montrent visiblement, une sensibilité aux OCs. Par ailleurs, de nombreuses souches tolérantes aux OCs ne montrent pas de changement d'abondance de leur communauté lorsque les doses en OCs augmentent (e.g., *Pseudomonas*, *Blastobacter*, *Rhodoplanes*, *Devosia*, ...). Cependant, leur abondance stable peut suffire à assurer une bioremédiation efficace des OCs puisque certaines de ces souches sont décrites comme biodégradantes pour le lindane ou certains chlorobenzènes (Phillips et al, 2005).

L'exposition des plantes à des doses élevées en OCs montre que la microflore rhizosphérique semble pouvoir s'adapter à cette pression chimique se traduisant par une augmentation significative de l'abondance de certaines souches bactériennes. Les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes exposées aux OCs sont dominées par les Ordres *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* et *Xanthomonadales* (**Fig 61**). Notamment, les genres *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Tistrella*,... sont tolérants aux OCs (Phillips et al, 2005, Adebuse et al. 2008) et peuvent assurer une biodégradation importante des OCs. L'utilisation des OCs comme source de carbone couplée à la disparition numérique des souches sensibles aux OCs peut expliquer l'augmentation de l'abondance opportuniste de ces genres bactériens.

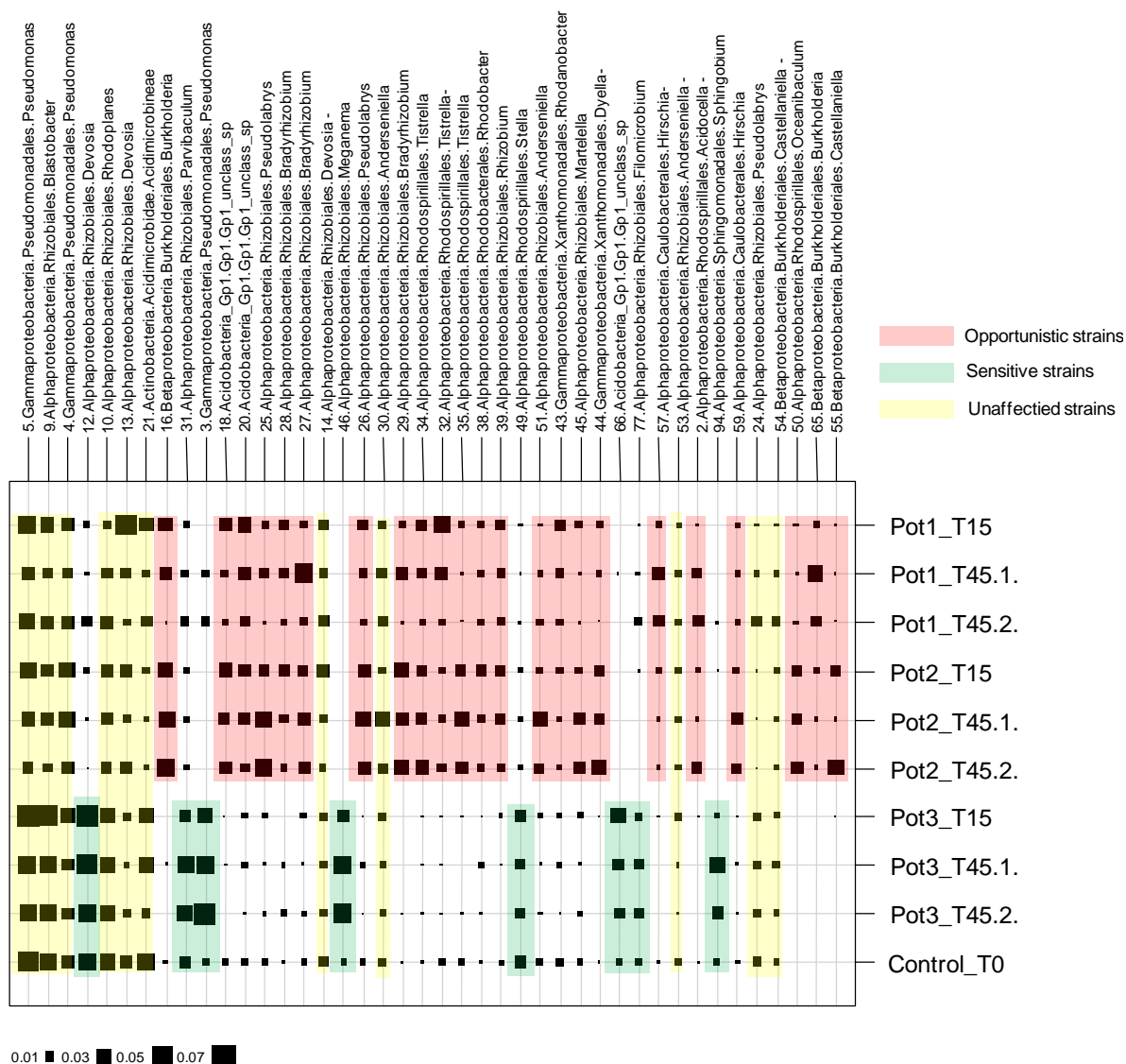


Figure 61 : Distribution spatiale et temporelle des principaux MOTUs issus des échantillons de rhizosphère de *P. australis*. Les colonnes du diagramme représente les 42 plus abondants MOTUs. Les lignes représentent les échantillons. L'échelle de taille indique la fréquence des souches dans chaque échantillon.

III. Conclusions

Les premiers résultats de l'étude ont démontré que l'exposition aux OCs ne provoquait pas de modifications des communautés fongiques de la rhizosphère, quelque soient les concentrations appliquées. Ces observations nous renseignent sur une possible tolérance de ces communautés aux OCs, qui pourraient alors être impliquées dans un processus de bioremédiation. Des études complémentaires sur les communautés fongiques de la rhizosphère seraient dans ce cas nécessaires pour répondre à ces hypothèses de départ (Phillips et al. 2005, Joseph et al. 2010, Sagar and Singh 2011) (Marco-Urrea et al. 2009).

En revanche, le suivi comparatif des communautés bactériennes de la rhizosphère en présence ou en absence des OCs, a révélé une divergence structurale corrélée au gradient d'exposition. Par des analyses d'isolement classique et d'approches moléculaires de la rhizosphère, nous avons pu mettre en évidence plusieurs aspects de cette dynamique des communautés microbiennes :

- Certaines souches bactériennes sont sensibles aux expositions OCs, en mono- et multi-exposition, e.g. *Hevizibacter* et *Acidovorax*.
- Une seule souche de la classe des *Aphaproteobacteria* apparait tolérante aux chlorobenzènes mais sensible au γ HCH.
- Les souches bactériennes cultivées à partir de rhizosphère exposée aux OCs ont été testées et apparaissent effectivement tolérantes au traitement OCs. Les souches de type *Pseudomonas sp*, *Bacillus* et *Rhodococcus sp* sont reconnus pour leur capacité à dégrader certains polluants organiques chlorés (Koch et al. 1991, Whyte et al. 2002, Rapp and Gabriel-Jurgens 2003), ainsi que *Exiguobacterium* (Sharma and Rehman 2009) *Paenibacillus* (Ramachandra et al., 2001), *Aeromonas* (Mrozik et al. 2003), *Arthrobacter* (Jagnow et al. 1977), *Burkholderia* (Wood 2008), et *Sphingomonas* (Vidali 2001), également présents dans notre étude.
- Les techniques de SSCP et de pyroséquençage ont permis de mettre en évidence la disparité des communautés bactériennes entre les échantillons de rhizosphère exposés ou non aux OCs. Les souches bactériennes ont été classées en fonction de leur abondance (MOTUs) démontrant que les souches majoritairement représentées au

niveau rhizosphérique ne sont pas cultivables. Par ailleurs, la comparaison des abondance entre rhizosphère exposée ou non OCs a permis de mettre en évidence : **(1) les souches sensibles** à la pression chimique, dont la population est fortement réduite au cours du temps ou a disparue. **(2) les souches tolérantes non affectées** par la pression chimique, pour lesquelles le pression chimique n'agit pas sur la structure ni l'abondance des communautés, et **(3) les souches tolérantes opportunistes**, dont l'abondance communautaire est favorisée par le traitement.

L'analyse des résultats basé sur une sélection des communautés les plus abondantes (représentant 50% de la population entière) n'aura pas permis d'obtenir des conclusions significative chez *Z. mays*. La flore bactérienne de la rhizosphère de *Z. mays* semble effectivement être perturbée par les traitements OCs au vu des résultats de SSCP (**Fig 58**). Cependant les données obtenues par la méthode du pyroséquençage ne laissent apparaître aucune spécificité des communautés bactériennes. Les perturbations semblent intervenir à un autre niveau, non pas sur les souches les plus abondantes (**Fig 61**), mais sur les souches **les moins représentées**. En effet, observées individuellement ces souches moins abondantes sont plus variées et pourraient expliquer ces différences de profil des communautés bactériennes.

Les résultats sur *P. australis* ont été réalisés avec succès, en utilisant les 42 communautés les plus abondantes (représentant 50% de la population entière). Au niveau de la rhizosphère des *P. australis*, la pression chimique des OCs apparaît comme un événement fortement sélectif des communautés microbiennes. L'abondance des communautés opportunistes augmente en fonction du temps d'exposition, du gradient d'exposition OCs et de l'élimination ou la réduction des communautés bactériennes sensibles. Certaines souches cultivables sont tolérantes et décrites dans la littérature comme étant actives et efficace dans la rhizoremédiation de polluants organiques chlorés (Phillips et al. 2005).

Publication 5

En préparation pour Environmental microbiology

**Effects of organochlorines on microflora diversity and community structure in
Phragmites australis rhizosphere**

San Miguel A., Roy J., Gury J., Monier A., Coissac E., Ravanel P., Geremia R.A., Raveton M.

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041
Grenoble Cedex 09, France.

1 Introduction

Organochlorines (OCs) are part of ubiquitous pollutants in aquatic and soil environments, generated from anthropogenic activities intensively used in industrial process and agricultural applications (Matsumoto et al. 2009). Lindane (γ -hexachlorocyclohexane, HCH) was one of the most extensively used OC to control a wide range of agricultural, horticultural and public health pests (El-Shahawi et al. 2010). Intermediate substances in the production process often include several isomers of chlorinated phenols and benzenes. The use and production of the OCs has resulted in environmental contamination of global dimensions and their high stability for the majority of them generates serious problems in a variety of circumstances around the world (Vijgen et al. 2010). The OCs contaminating most polluted sites are a complex mixture of chlorobenzenes, chlorophenol, chlorinated solvents and benzene (Feidieker et al. 1995, Zacharias et al. 1995, Braeckevelt et al. 2008).

A cost-effective and environmentally friendly technology for decontamination of soils and sediments, which potentially could be applied to large-scale areas, is phytoremediation (Langergraber and Haberl 2001, Chaudhry et al. 2005, Schröder et al. 2007). A promising phytoremediation technology is to utilize constructed wetlands (CW) for their plant diversity (phytoplankton, hydrophytes, helophytes) and their anaerobic/aerobic mixing zones in sediments. CW can be easily integrated into the landscape, and may lead to an efficient removal of organic contaminants (Lorah and Voytek 2004). Wetland plants, such as *Phragmites communis* and *Typha angustifolia*, have shown potential for the phytoremediation of chlorinated contaminants (Ma and Burken 2002, Sinha 2002, Miglioranza et al. 2004, Zhang et al. 2005, Gomez-Hermosillo et al. 2006, Monferran et al. 2007, Ma and Havelka 2009). Recent studies demonstrate significantly enhanced dissipation and/or mineralisation of persistent organic pollutants at the root–soil interface or rhizosphere (Anderson et al. 1993) (Anderson and Coats 1995, Kuiper et al. 2004, Chaudhry et al. 2005, Krutz et al. 2005, Pilon-Smits 2005, Kidd et al. 2008, Gerhardt et al. 2009). The rhizosphere is a densely populated area in which elevated microbial activities are observed and plant roots interact with soil microorganisms through exchanges of nutrients, growth factors, etc. (Ryan et al. 2001, Abhilash and Singh 2009). Plants are able to stimulate the rhizosphere community influencing its biodegradation capacities in different ways: increase pollutant bioavailability, induction of enzyme activities involved in the degradation process, and/or selectively increase the number and activity of pollutant degraders (Burken and Schnoor 1998, Grayston et al. 1998, Kozdroj

and van Elsas 2000, Macek et al. 2000, Miya and Firestone 2001, Shaw and Burns 2003). Phytoremediation, including rhizoremediation, appears to be particularly effective due to complementary process where that plants draw pollutants into their rhizosphere via the transpiration stream; subsequently the microbes-mediated degradation occurs in the rhizosphere, in the plant itself, or in both (Barac et al. 2004, Kirk et al. 2005, Muratova et al. 2008). Microbial biodegradation of OCs occurs both in anaerobic and aerobic compartments (Fathepure et al. 1987, Ricking and Schwarzbauer 2008, Lal et al. 2010). The basic steps of OC biodegradation pathways have been summarized in the literature (Chaudhry and Chapalamadugu 1991, Phillips et al. 2005, Field and Sierra-Alvarez 2008). Isolated OC degraders mostly belong to *Proteobacteria* (e.g. *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Acidovorax* sp., *Burkholderia* sp., *Pandoraea* sp.) (Tchelet et al. 1999, Alfreider et al. 2003, Nawab et al. 2003, Manickam et al. 2007, Nestler et al. 2007, Field and Sierra-Alvarez 2008) *Cyanobacteria* (e.g. *Anabaena* sp., *Nostoc* sp.) (Bueno et al. 2004), *Firmicutes* (e. g. *Bacillus* sp.) (Phillips et al. 2005), *Actinobacteria* (e. g. *Microbacterium* sp.) (Manickam et al. 2006) or *Chloroflexi* (e.g. *Dehalococcoides* sp.) (Adrian et al. 2000). Therefore, the success of such phytoremediation technologies is strongly linked to a selective rhizospheric microflora and to a tolerant plant. Assessing the diversity, distribution, physiology and ecology of rhizospheric microorganisms is a prerequisite for successful application of phytoremediation processes.

In this study, we aimed at exploring the in situ microbial community adaptation of *Phragmites australis* rhizosphere exposed to OCs. Plants were submitted to different chemical pressures inside the experimental pots, and rhizosphere bacteria were isolated and characterized by comparative sequence analysis of partial 16S RNA genes. Test of sensitivity/tolerance of isolated bacteria were performed in presence of OCs. The global rhizosphere microbial communities were determined by measuring *ssu* sequence diversity (pyrosequencing). By combining gene community profiling with multivariate statistical analysis, we attempted to determine OCs effects on diversity and structure of microbial communities in the *P. australis* rhizosphere.

2 Experimental procedures

2.1 Experimental design and sampling collections

Experiments were carried out in pots (20×20×40 cm) which were supplied by a hydraulic flow rate of 0.001 m³ h⁻¹. Each pot was filled with organic matter (12 dm³, peat) and planted

with common reed (*Phragmites australis*). These pots were cultivated during 2 months before the beginning of experiments. Based on previous studies (Cottin and Merlin 2010), the pots were treated by water contaminated by 1.4 mg l^{-1} for ΣHCH ($\alpha,\beta,\delta,\gamma$ -hexachlorocyclohexane isomers), 1 mg l^{-1} for MCB (monochlorobenzene), 1.5 mg l^{-1} for ΣDCB (1,3- and 1,4-dichlorobenzene) and 15 mg l^{-1} for ΣTCB (1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene). These concentrations were chosen on the basis of concentrations found in groundwater situated below industrial sites (Braeckevelt et al. 2007, Ricking and Schwarzbauer 2008, Frische et al. 2010). The experimental time-scale was 45 days in environmental conditions (july-september 2008). One control pot planted with *P. australis* was supplied with water and kept in the same environmental conditions.

Samples of rhizosphere were collected from *P. australis* growing in pot 1 (P1), pot 2, pot 3 (P3) and control at 15 days after the first exposure and 45 days after this first collection (Fig. 1). Root samples were taken from 3 different plants per conditions, by cutting roots at a 20-25 cm depth.

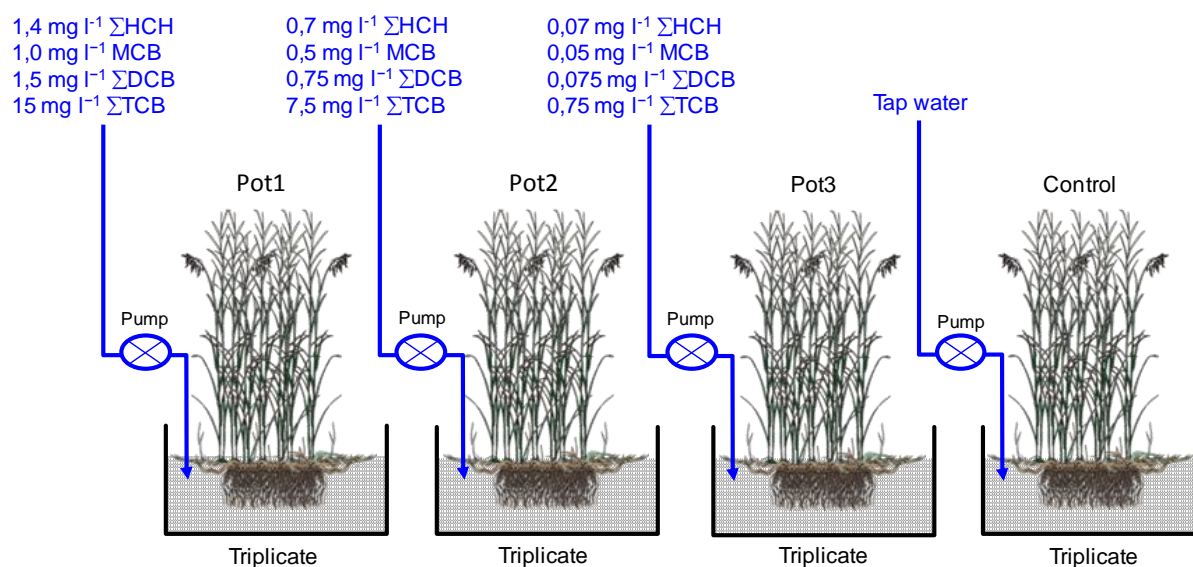


Figure 1 : Experimental design (reconstituted contaminated groundwater)

2.2 Isolation and OC-tolerance of Cultivable strains

Rhizosphere soil was removed by vortexing around 5g of fresh root material (20 min) in 20 ml reverse osmosis steril water and collecting the precipitated soil after centrifugation at 9000 rpm for 10 min at 4°C . The pellet was then suspended in M9 medium containing 40 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22 mM KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 , 100 mM CaCl_2 , 10 μM FeCl_3 , 1% thiamine and D-Glucose (1ml) and plated onto different agar mediums, rich LB

and poor 1/10 LB. These plates were incubated for 7 days at 27°C. All morphologically different bacterial colonies were selected and sub-cultured three times onto agar 1/10 LB medium to ensure purity and stability.

The abilities of the isolated strains to grow in the presence of OCs were test by plating onto LB agar containing 1 to 15 µg of each OC per plate and incubated during 7 days at 27°C. Controls were performed in same conditions without OC exposures. Each bacterial isolate was assessed under OC pressure 5 times.

2.3 DNA extraction and sequencing of cultivable strains

Individual selected colonies were suspended in 500µl sterilized de-ionised water and frozen at -20°C during 24h to release the DNA (Shahnavaz, 2009). Bacteria DNA was then amplified using microbial community-specific primers. Partial *ssu* gene were amplified using primers 27f (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and com2ph (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') (Marchesi et al. 1998, Schmalenberger et al. 2001). The PCR reactions (25 µl) were set up with, 2.5 mM MgCl₂, 10x of AmpliTaq Gold™ buffer, 20 g.l⁻¹ of bovine serum albumin, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.4 µM of each primer, 0.6 U tag gold polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 1µl DNA.

The thermal PCR profile was performed following different steps: an initial step at 95°C (10 min), followed by 30 cycles at 95°C (30 s), 56°C (15 s) and 72°C (15 s), and final step at 72°C (7 min). The PCR products were visualized on a 1.6% agarose gel and further submitted to automatic Sanger sequencing in a ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The sequence data was checked manually. The sequences were compared to the Nucleotide Sequence Database of Gene Bank using BLAST (Altschul (Altschul et al. 2010, Gish and Vogt 2010)(Lipman et al. 1989, Myers 1996) (October 1990). "Basic local alignment search tool". *J Mol Biol* **215** (3): 403–410.). The 100% similar sequences were used for taxonomic assignation and other similar sequences were used as reference in phylogenetic analysis.

2.4 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analyses of microbial diversity

DNA from 250 mg (fresh weight)/sample of rhizospheric soil, obtained as described above, was extracted using the Power Soil™ Extraction Kit (MO BIO Laboratories, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) following the manufacturer's instructions and the concentration

was obtained using a NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Genetic profiles of the bacterial community were generated with the SSCP method as described previously (Zinger et al. 2007, Gury et al. 2008). DNA was amplified using microbial community-specific primers, W49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3') and W104-FAM (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') labeled with 50-fluorescein phosphoramidite (FAM) (Zumstein et al. 2000, Duthoit et al. 2003) and submitted to capillary electrophoresis-SSCP (CE-SSCP) as described later.

The PCR mixtures (25 µl) were set up with, 2.5 mM of MgCl₂, 1x of AmpliTaq Gold™ buffer, 20 g.l⁻¹ of bovine serum albumin, 0.1 mM of each dNTP, 0.26 mM of each primer, 2 U tag gold polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 1 µl of DNA (1–10 ng DNA). The PCR reaction was performed following: an initial denaturation at 95°C (10 min), followed by 30 cycles at 95°C (30 s), 56°C (15 s) and 72°C (15 s), and the final elongation step at 72°C (7 min). The PCR products were visualized on a 1.6% agarose gel.

As described in Baptist et al. (2008), amplicons of each microbial community were pooled for each sample to perform multiplex Capillary electrophoresis-SSCP. PCR products were separated by capillary electrophoresis performed on an ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using a 36-cm length capillary. The CE-SSCP reactions were prepared with 10 µl of deionized formamide Hi-Di (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), 0.2 µl of Genescan-400 HD ROX size standard internal DNA molecular weight marker (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), 0.5 µl NaOH (0.3 M) and 1 µl of the PCR product. The mixture was denatured at 95° for 5 min (Applied Biosystems, Gene Amp ® PCR system 2700) and immediately cooled, placed 5 min on ice prior to injection. The injection time and voltage were set to 22 s and 6 kV, respectively and electrophoresis was performed for 35 min. The nondenaturing polymer consisted of 5% CAP polymer, 10% glycerol and 3200 buffer. The CE-SSCP profiles were then, normalized in order to control for differences in the total fluorescence intensity between profiles.

The normalized profiles of SSCP were analysed by Neighbour-Joining analysis based on a matrix of Edwards distances (Edwards 1971). The robustness of the resulting tree was assessed using 1000 bootstraps. The data analysis was performed using the Ape package of the R software (R Development - CoreTeam, 2010).

2.5 Bacterial community analysis by 454 pyrosequencing

The *ssu* primers adapted to 454 pyrosequencing were designed using EcoPrimer (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/ecoPrimers/wiki/WikiStart>) and RDP database. First, the RPDII database release 10 was filtered to keep only complete sequences with a taxonomic annotation; the resulting database contains 63319 sequences representing 28782 species. Second, using the ecoPrimer, we selected primers amplifying fragments between 150 and 430 bp allowing 2 mismatches and with a strict 3' end match. The taxonomical specificity and coverage was evaluated with ecoTaxSpecificity and ecoTaxStat. The couple 5'CCTACGGGAGGCAGCAGT3' / 5'CTACCAGGGTATCTAATC3' was selected. All primers were modified by the addition of specific tags (7-mer) on the 5' end to allow the assignment of sequence reads to the relevant sample. The 7-mer nucleotides were designed using oligoTag (www.prabi.grenoble.fr/trac/OBITools) with at least three differences among the tags, without homopolymers longer than two bases, and avoiding a C on both 3' and 5' end. Additionally, the sequencing primers were added at the 5' end of the sample tags. DNA amplifications were carried out in a final volume of 25 µL, using 1 µL of DNA (10 ng) extract as template. The amplification mixture contained 1 U of AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), 10 mM Tris-HCl, 2.5 mM of MgCl₂, 0.05 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, and 0.005 mg of bovine serum albumin (BSA, Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). The mixture was denatured at 95°C for 10 min, followed by 30 cycles of 15 s at 95°C and 48°C for 15s then, an elongation step at 72°C for 20s. Seven PCR reactions were performed for each sample. All the PCR products from the different samples were first titrated using capillary electrophoresis (QIAxel, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and then mixed together, in equimolar concentration, before the sequencing. The sequencing was carried out on the Roche Sequencer GS FLX Titanium series (454 Life Sciences GS FLX systems (Roche, Basel, Switzerland) by DNAVision (Charleroi – Belgium). The reads were between 350 and 460 nucleotides.

2.6 Sequence analysis and taxonomic assignation

The sequence reads were analyzed using the OBITools (www.prabi.grenoble.fr/trac/OBITools). First, primers and tags were identified using the fasta454Filter tool. Only sequences with perfect match on tags a maximum of two errors on primers were taken into account. The amplified regions, excluding primers and tags, were kept for further analysis. Sequences shorter than 350 bp, or containing nucleotides other than

A, C, G and T, or with occurrence lower or equal to 10 were excluded using the obigrep program. A total of 116,066 reads were recovered after filtering. The redundant reads were then dereplicated using obiuniq, producing a set of 88,286 dissimilar reads, which were used for subsequent analyses.

2.7 Creating MOTU clusters and calculating richness

For MOTU definition, we aligned dereplicated sequences using an exact global alignment algorithm (Needlema.Sb and Wunsch 1970) running in 'sumatra' software (E. Coissac, unpublished). MOTUs were created from the distance matrix by using the non-hierarchical clustering method MCL (Markov Clustering (Van Dongen 2008)). This clustering step was applied at a similarity threshold of 97% and produced an abundance matrix of MOTUs per locations, which was then used for subsequent diversity analyses. Finally, the most represented sequences for each cluster (≤ 3) were identified using the RDP II Classifier (Wang et al. 2007). This taxonomic assignment was kept for further analysis.

2.8 Statistical analyses

We used first, the Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination analysis based on a dissimilarities matrix computed from the Bray-Curtis distance to compare the dissimilarities of rhizosphere microbial communities between conditions (vegan R package, Oksanen 2009) (<http://www.R-project.org>). This method consists on an iterative algorithm in order to reduce multidimensional dissimilarities data to a low-dimensional ordination indicating relative similarity of samples through relative ordination distance (so that, e.g. very similar samples are close together) (Clarke 1993, Bennett et al. 2008). Further, NMDS solution was obtained using Kruskal's stress value, which should be less than 0.2 to give an accurate picture (Clarke 1993). Rhizosphere bacterial communities ordinations and distributions of the different samples, were then represented in a plot of the first two NMDS solution dimensions. NMDS was performed using both a complete dataset and a dataset containing only the most abundants MOTUs in order to assess if patterns observed could be attributed to the abundants MOTUs. Most abundants MOTUs were MOTUs whose reads count represented more than 1% of the all reads. Procrustean analysis (Peres-Neto and Jackson 2001) was used to assess the overall degree of correlation between the two NMDS ordinations. We used non parametric multivariate analyse of variance (Anderson 2001), with the R 'adonis' function, to test for the effect of the different conditions on bacteria assemblages. Significance for both procrustean

and multivariate analyse of variance was assessed by the mean of 999 Monte Carlo permutations procedure.

2.9 Abundance of MOTUs between samples:

2.9 Abundance of MOTUs between samples:

On the basis of the extensive sequence data, a rank abundance distribution (RAD) was modeled. That kind of analysis can provide an integrate understanding of the underlying ecological rules that govern microbial diversity and abundance (Dunbar et al. 2002, McGill et al. 2007). Then in regards to the results obtained, we choose to select the 42 most abundant MOTUs (>1%) which represent 47.3% of all the sequences, to have a visual abundant representation of each MOTUs from all conditions.

The relative abundance of specific bacterial groups was studied and give us a frequency of each MOTUs within each sample.

All statistical analyses were carried out with the R 2.13.1 software (R_Development_Core_Team, 2010) using the vegan 2.0-0 (Oksanen 2004), ade4 (Dray and Dray and Dufour 2007) BiodiversityR (Kindt and Coe, 2005) packages and APE packages (Paradis et al. 2004).

3 Results

3.1 Effect of OCs on microbial diversity

The SSCP technique was used for monitoring microbial community profiles in *P. australis* rhizosphere exposed or not to OC . At the initial time, rhizosphere bacterial community's profiles were statistically similar between each condition (control, P1, P2 and P3). After 45 days of exposure, when the patterns of each particular condition were compared with each other, similar results were found for control and P3 rhizosphere microbial profiles (Fig 2). On the other hand, for P1 and P2 bacterial community profiles there were clear differences compared to the control and the P3 profiles. Therefore OCs treatment caused significant disturbances on the bacterial community profiles of *P. australis* rhizosphere.

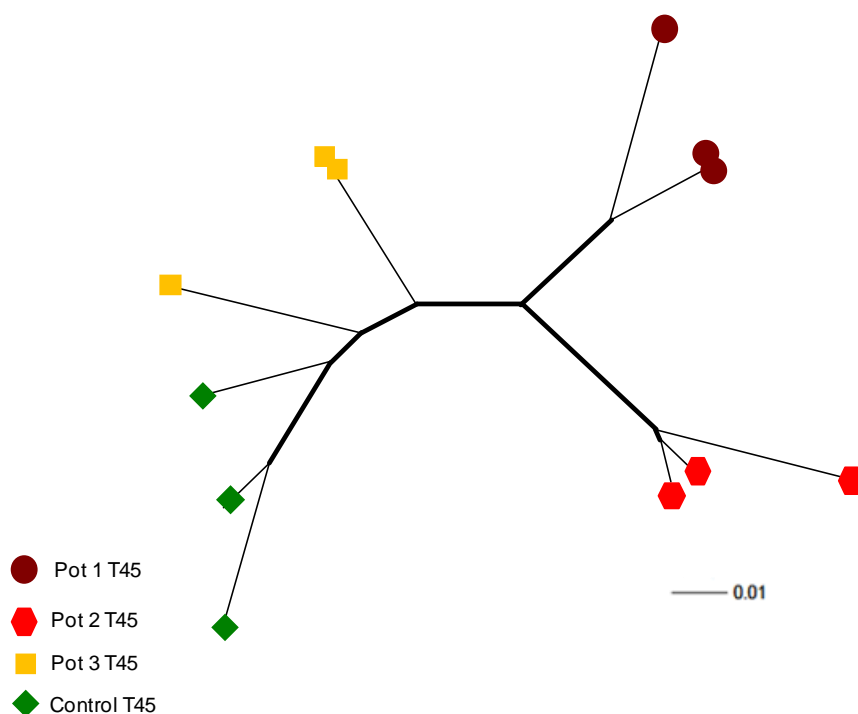


Figure 2 : Molecular profil of bacterial communities, after 45 days of treatment, evaluated by SSCP. Thick lines indicate branches supported by a bootstrap value >500

3.2 Isolation of cultivable bacterial from *P. australis* rhizosphere :

The selection of morphologically different colonies from cultures inoculated with soil rhizosphere resulted in stable 78 strains, representative of cultivated aerobic. The cultivated strains were characterized by comparative sequence analysis of 16S rDNA generated by PCR. Identification of bacteria was limited to genera based upon 16S rRNA gene sequence similarities within sequences observed for species of the respective genera. Identified strains were classified in a phylogenetic dendrogram shown in figure S1, where the 78 isolates were clustered into four different phyla, including three classes of *Proteobacteria* (*Alpha*- ; *Beta*- ; and *Gamma*-). Most of isolates were commonly found in all conditions tested from control to OC-exposures. Nevertheless, some specific differences could be notified based on presence/absence of strains. *Flavobacteria* and *Sphingobacteria* classes were only isolated from rhizosphere in control and P3 conditions, indicating their possible sensitivity to OCs. This sensitivity was confirmed by their inability to grow in the presence of any of the OCs compounds (Table S1). On the other hand, isolates belonging to *Fimicutes* were only isolated from rhizosphere in P1 and P2 conditions which contain high concentrations of OCs. Isolates as *Exiguobacterium* sp., *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. showed tolerance to OCs compounds (Table S1).

Table S1 : Growth characteristics of different bacterial strains isolated from *P. australis* rhizosphere soil material

Phylum		Genus	γ -HCH	TCB	DCB	MCB	MIX
Class							
Tolerant strains	Actinobacteria						
	Actinobacteridaea	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+
		<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+
	Proteobacteria						
	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	+	+
	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+	+
		<i>Aeromonas</i>	+	+	+	+	+
	Firmicutes						
	Bacilli	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+
		<i>Exiguobacterium</i>	+	+	+	+	+
Sensitive strains	Bacteroidetes						
	Flavobacteria	<i>Hevizibacter</i>	-	-	-	-	-
	Actinobacteria						
	Actinobacteridaea	<i>Curtobacterium</i>	-	-	-	-	-
	Proteobacteria						
	Alphaproteobacteria	<i>Bacterium</i>	-	+	+	+	-
	Gammaproteobacteria	<i>Frateuria</i>	-	-	-	-	-
	Betaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	-	-	-	-	-
	Sphingobacteria	<i>Arcicella</i>	-	-	-	-	-

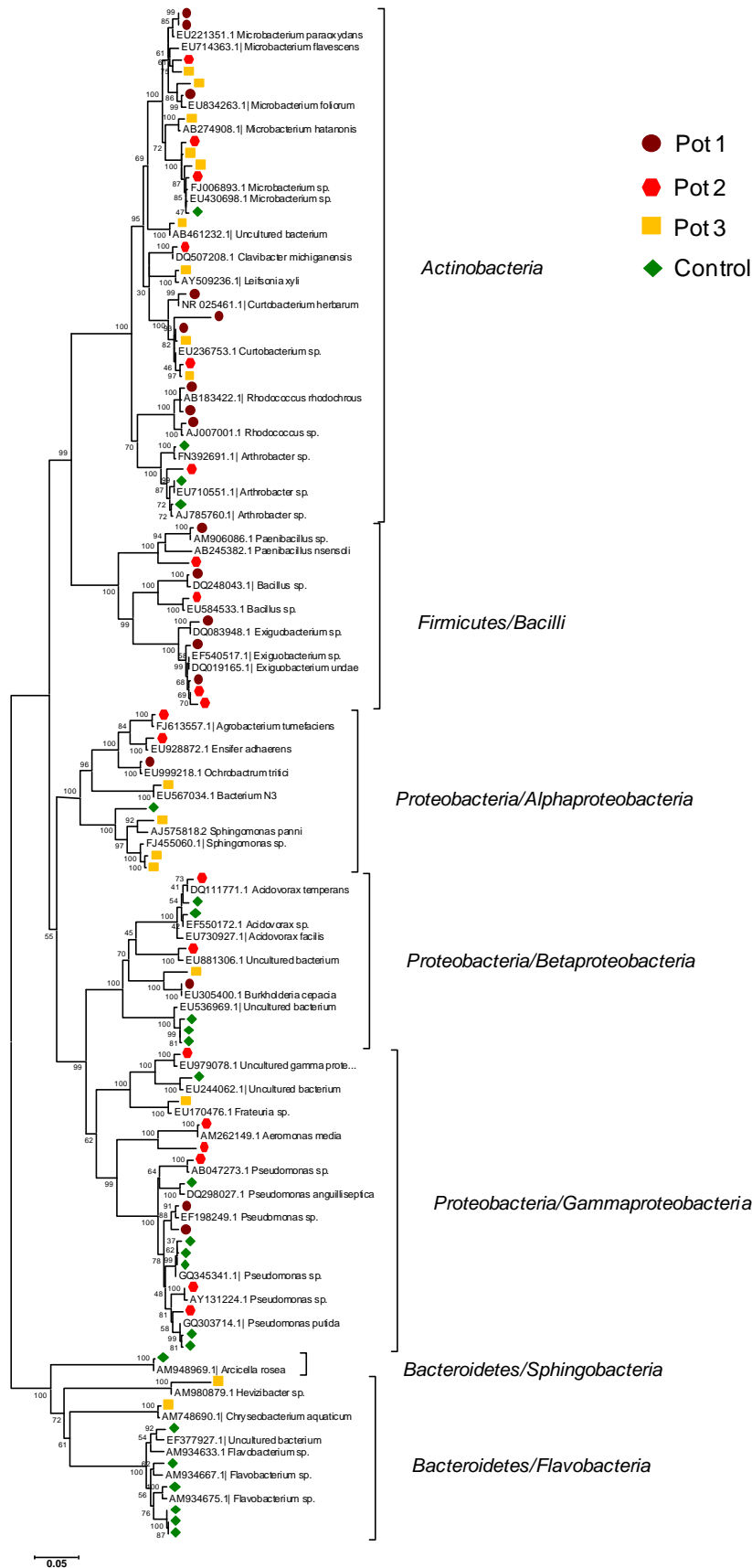


Figure1S : Phylogenetic tree of 78 bacteria isolated from *P. australis* rhizosphere. Phylogenetic tree based on 16S rRNA fingerprints was inferred using neighbor-joining method

3.3 Uncultivated bacterial communities analysis:

From SSCP analyses (Figure 2), the similarity of community profiles between the triplicates of each condition seemed to be consistent. Therefore, we chose to test just one replicate of each condition for the following 454 pyrosequencing analyses.

3.3.1 NMDS statistical analysis:

Use of NMDS ordination was twofold as we both described the overall dissimilarities in bacterial assemblages as well as we assessed the role of the most abundant MOTUs in the dissimilarities patterns of bacterial assemblages. Comparing the data obtained with all MOTUS and those with the 42 most represented (Fig. 3), there are only minor changes in NMDS ordinations, and procrustean analysis showed significant and high correlation between the two ordinations ($r=0.97$, $p<0.001$).

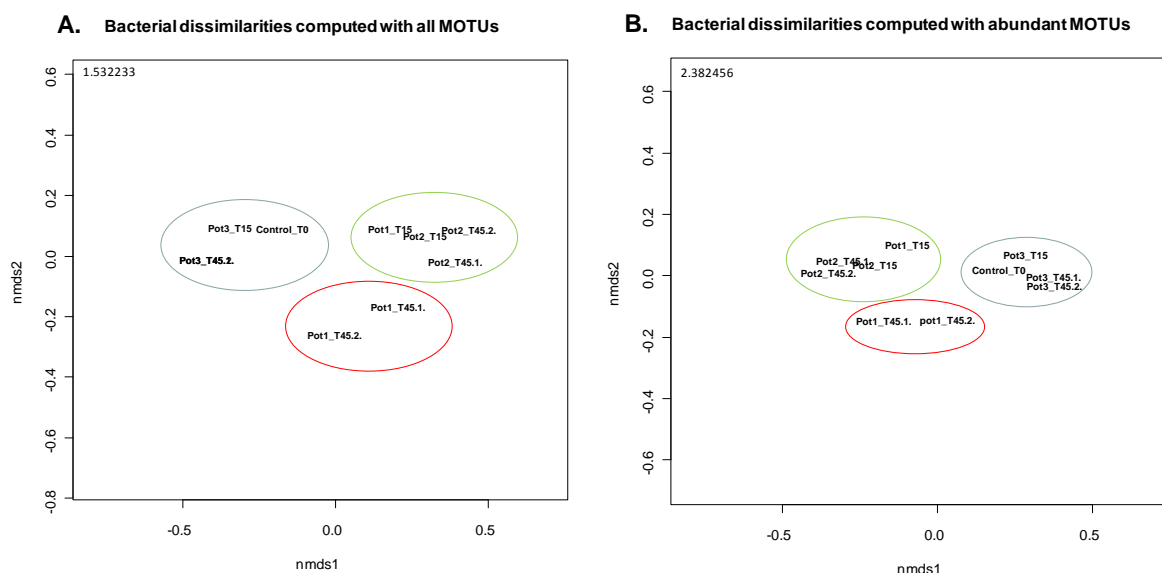


Figure 3 : Two-dimensional NMDS ordination using Kruskal stress value as a measure of dissimilarities. MOTUs were identified according to their treatment category. **A.** Bacterial dissimilarities computed with all MOTUs. **B.** Bacterial Dissimilarities computed with abundant MOTUs.

Regarding conditions of exposure $p = 0.001^{***}$; $R^2 = 0.617$

Regarding time exposure $p = 0.035^*$; $R^2 = 0.164$

Low two-dimensional stress values ($<20\%$) for NMDS ordinations were obtained in all conditions, indicating minimal changes in the distribution of the samples and in their dissimilarities. These results justify our choice to search for site specificity for the most abundant MOTUs that seems to play a major role in the variation of communities' composition. Three different clusters which differ to each other are visible. The blue group comprises Pot3 and the control sample (without OCs), indicating the concentrations of OCs

used have little effect on bacterial communities. The second group in green comprises Pots 2 at 15 and 45 days and Pot 1 at 15 days of treatment suggesting disturbance inside the communities by the OCs cocktail at intermediate concentrations, in Pot2 and at highest concentrations, in Pot1 after 15 days of treatment. In the Pot2, rhizospheric bacterial communities seem to be stabilized between 15 and 45 days of treatment. The last case in red, representing the most contaminated condition Pot1 at 45 days, shows another distribution from the others. Indeed, Pot1 case, under a high chemical pressure, sees its rhizosphere composition changing and shows no sign of stabilization after 15 days, moving until 45 days of exposure. All these results, complement our previous observations (fig 2). Thus, the found pattern indicates that chemical pressure plays a role on the composition of the rhizospheric bacterial communities, influencing on their composition and their distribution.

3.3.2 Abundance of communities :

The monitoring of bacterial communities shows significant structuring of communities according to the amplitude of OCs chemical pressure. This disparity is expressed by differences in abundance of some bacterial MOTUs selected or counter-selected by the exposure to OCs. Differences of sensitivity are observed with decreases or loss of certain bacterial MOTUs at highest concentrations. That's the case of MOTUs number 12, 31, 3, 46, 49, 66, 77 and 94 associated with the genera *Parvibaculum* sp, *Meganema* sp, *Stella* sp, *Filomicrobium* sp respectively, which show sensitivity to the OCs. In addition, many OCs tolerant strains show no changes in abundance of their community, increasing OCs doses (e.g, MOTUs n° 5, 9, 4, 10, 15, 21, 14, 30, 53, 24 and 54: *Pseudomonas*, *Blastobacter*, *Rhodoplanes*, *Devosia* ...). However, their abundance may be enough to ensure an effective OCs biodegradation. In the literature, some of strains related to the MOTUs described here are described as able to biodegrade lindane or some chlorobenzenes (Phillips et al, 2005).

A third case is observed with a significant increase of some bacterial strains abundance. Rhizospheric bacterial communities of plants exposed to OCs, are dominated by the orders *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, *rhizobial*, and *Rhodospirillales* *Xanthomonadales* (fig 4). That's the case of the genera MOTU n°16, 18, 20, 25, 28, 27, 26, 29, 34, 32, 35, 38, 39, 51, 43, 45, 44, 57, 2, 59, 50, 65 and 55 : *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Tistrella*,... which are also described to be tolerant to the OCs (Phillips et al. 2005, Adebuseye et al. 2007) and likely to provide significant OCs biodegradation. The use of OCs as a carbon source coupled to the

disappearance of some sensitive strains to the OCs, may explain the increased abundance of opportunistic bacterial genera.

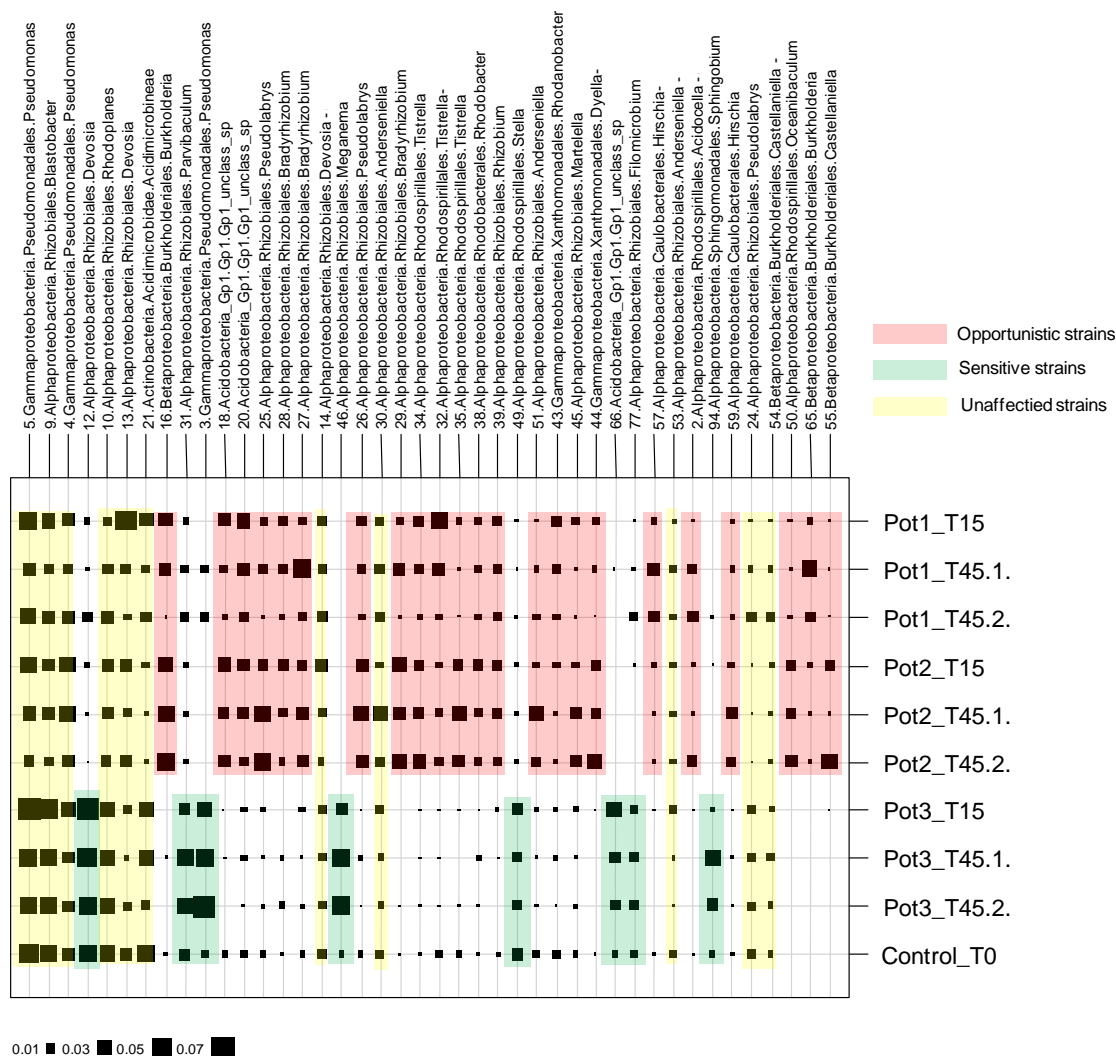


Figure 4 : Spatial and temporal distribution of the main MOTUs. The columns of diagram represent the 42 most abundant MOTUs. Line of the diagram represent samples. Square size indicates the frequency of strains in each sample.

4 Discussion

The composition and dynamic of the microbial community play a key role in the rhizosphere functioning. The community assembly of bacteria in rhizosphere exposed to organic pollutants is little understood. Most of previous studies have reported efficiency of pollutants biodegradation (Singh 2003, Chaudhry et al. 2005, Kidd et al. 2008, Abhilash and Singh 2009, Nie et al. 2009, Toyama et al. 2010a, Becerra-Castro et al. 2011). However, the bacterial clades responsible for these biodegradations remain

partially characterized. The previous molecular studies regarding organic pollutant degradation in the rhizosphere showed specificities depending on soil types, plant species and pollutant class (Kuiper et al. 2004, Ruiz-Rueda et al. 2009, Toyama et al. 2009, Toyama et al. 2010b, Ma et al. 2011, Toyama et al. 2011). In this study we examined the phylogenetic structure of bacterial communities from *P. australis* rhizosphere exposed to a gradient of organochlorine pollutants (Σ HCH, chlorobenzenes). The bacterial SSCP patterns previously shown to be specific for a given of bacterial community (Zinger et al. 2007) was performed for each concentration of OCs mixed pollution exposure. Here, the bacteria profiles in rhizosphere showed effects supported by bootstrapping for most exposures. Therefore, relevant changes in bacterial diversity can be detected in function of the degree of exposition to OCs. Here, exposure must have favoured the selection of strains able to degrade the organochlorine compounds. This observation is consistent with previous reports in which pesticide-mineralizing strains could be isolated only from agricultural soils (De Souza et al. 1998, El-Fantroussi 2000, Nishino et al. 2000).

A large number of distinct colony morphotypes were isolated from the rhizosphere soil of *P. australis* (Table 1a). Of the 78 isolates that were analysed by partial 16S rDNA sequence analysis, a diversity of sequence types was observed from seven different classes, including genera commonly found in the soil environment as *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Arthrobacter* sp., and *Sphingomonas* sp. Previous studies published similar cultivable strains isolated from *Phragmites* sp. rhizosphere (Ruiz-Rueda et al. 2009, Toyama et al. 2009) and described these strains as biodegraders of chlorinated compounds (Vidali 2001, Whyte et al. 2002, Mrozik et al. 2003, Rapp and Gabriel-Jurgens 2003, Wood 2008, Sharma and Rehman 2009). From *P. australis* rhizosphere only six isolates could not be reliably assigned to a genus, based upon the 16S rDNA sequence similarities. Genera such *Arcicella*, *Hevizibacter* and *Flavobacterium* were specifically isolated from samples not exposed to OCs. These bacteria isolates were not able to grow in presence of OCs, demonstrating their sensitivity to OCs (in single- and mixed-exposure). On the other hand, *Firmicutes* (e.g., *Bacillus* sp., *Exiguobacterium* sp.) were only isolated from rhizosphere of *P. australis* exposed to OCs, and showed tolerance to all OCs. On the 78 isolates, 60.3% showed tolerance of each OCs and to the joint mixture of OCs.

The combined occurrence of HCH and CBs tolerance might be due to common mechanisms, which have been demonstrated for aerobic/anaerobic degradation of these compounds. Biodegradation of HCH and CBs has been reported for bacterial strains possessing dehalogenase activities (Ricking and Schwarzbauer 2008, Lal et al. 2010) (Fathepure et al. 1987, Chaudhry and Chapalamadugu 1991, Adrian et al. 2000, Lal et al. 2010). The fact that some strains showed better growth on medium containing OCs suggests that OCs can be used as a substrate. Further studies are necessary to ascertain the tolerance and/or degrading ability of selected strains isolated from *P. australis* rhizosphere to possible intermediates produced during the degradation of OCs.

From the rhizosphere, cultivable strains represent a minor percentage of the microbial communities (Stursa et al. 2009). Therefore, in order to determine whether there was selection for specific bacterial phenotypes in the presence of OCs, the molecular phylogenetic techniques were used to characterize the natural microbial biota without cultivation (Zinger et al. 2007). The microbial diversity was determined using 454 Pyrosequencing, where the rarest MOTUS_{97%} (i.e. containing less than 5 sequences) were not considered in the analysis of microbial communities due to their ambiguity. Our results showed a significant effect of OC-exposure at the phylum and subphylum levels and even at the finer taxonomic level (Fig 4). In presence of OCs (whatever the time of exposure), two MOTUS (*Meganema*, unclassified *Acidobacteria*) were not detected and appeared sensitive to OCs. On the other hand, *Rhodospirillales* and *Burkholderiales* (MOTUs 50, 55, 65) were specific to these types of OC-exposures. However, only few MOTUs were found strictly specific to one type of OC-exposure and the differences of microbial communities between the expositions were rather expressed in terms of abundance (Fig 4). *P. australis* rhizosphere exposed to OCs was dominated by phylotypes related to *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-*proteobacteria*. These dominance patterns were stable in function of time OC-exposure. Most of these MOTUs were not cultivated here as bacterial strains. It is obvious that OC-concentrations imitating contaminated groundwater induced an adaptation of rhizospheric bacterial population dominated by OC-tolerant strains. Among these dominant MOTUs, specific genera were identified which were previously described as chlorinated organic pollutant degraders *Pseudomonas* sp (Rapp et Gabriel-Jürgens 2003, Whyte et al., 2002), *Burkholderia* (Wood, 2008) and as potential chloroaromatic degraders for *Devosia* (Verma and Pillai 1991, Nestler et al. 2007). OCs exposure induced microbial community adaptation in the *P. australis* rhizosphere where 55% of MOTUs

appeared to be opportunists, 25% of tolerant strains (for which abundance were unaffected by the OC-exposure) and 20% of sensitive strains. These modifications in the microbial structure communities highlighted (i) the dynamic of the rhizosphere microflora, (ii) the opportunism of some bacterial strains and (iii) the adaptation of the rhizosphere functioning exposed to OCs.

These results may thus be useful to predict microbial successions in the framework of longer time scale studies with OCs mixed pollution stressors. Under OCs exposures, plants provide a protective habitat to these strains by releasing nutritive exudates and stimulating selective strain growth. Opportunist and tolerant strains (as single bacterial strain or as a syntrophic bacterial consortium) could insure a rhizodegradation of OCs; subsequently the microbes-mediated degradation occurs in the rhizosphere, in the plant itself, or in both (Barac et al. 2004). Moreover, a major limiting factor for phytoremediation of recalcitrant organic pollutants is often their low bioavailability. Biosurfactant produced by microorganisms can increase contaminant availability, plant uptake and/or microbial degradation (Schwitzguebel et al. 2002, Megharaj et al. 2011). Some strains have been described to produce biosurfactants (e.g. *Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp.) (Taghavi et al. 2009, Becerra-Castro et al. 2011) improving bioavailability of HCH isomers. These strains were detected in isolates and identified by molecular analyses in the *P. australis* rhizosphere. Overall, our results indicate that *P. australis* harbours active microbial population which can tolerate OCs and potentially improve the OCs remediation process.

References

- Abhilash, P. C., and N. Singh. 2009. Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 727-740.
- Adebusoye, S. A., F. W. Picardal, M. O. Ilori, O. O. Amund, C. Fuqua, and N. Grindley. 2007. Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils. *Chemosphere* 66: 1939-1946.
- Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke, and H. Gorisch. 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408: 580-583.
- Alfreider, A., C. Vogt, and W. Babel. 2003. Expression of chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in chlorobenzene-contaminated subsurface samples. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1372-1376.
- Altschul, S. F., J. C. Wootton, E. Zaslavsky, and Y. K. Yu. 2010. The Construction and Use of Log-Odds Substitution Scores for Multiple Sequence Alignment. *Plos Computational Biology* 6.
- Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32-46.
- Anderson, T. A., and J. R. Coats. 1995. SCREENING RHIZOSPHERE SOIL SAMPLES FOR THE ABILITY TO MINERALIZE ELEVATED CONCENTRATIONS OF ATRAZINE AND METOLACHLOR. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 30: 473-484.
- Anderson, T. A., E. A. Guthrie, and B. T. Walton. 1993. BIOREMEDIATION IN THE RHIZOSPHERE. *Environmental Science & Technology* 27: 2630-2636.
- Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J. V. Colpaert, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22: 583-588.
- Becerra-Castro, C., P. S. Kidd, A. Prieto-Fernandez, N. Weyens, M. J. Acea, and J. Vangronsveld. 2011. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant and Soil* 340: 413-433.
- Bennett, L. T., S. Kasel, and J. Tibbits. 2008. Non-parametric multivariate comparisons of soil fungal composition: Sensitivity to thresholds and indications of structural redundancy in T-RFLP data. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1601-1611.
- Braeckevelt, M., G. Mirschel, A. Wiessner, M. Rueckert, N. Reiche, C. Vogt, A. Schultz, H. Paschke, P. Kusch, and M. Kaestner. 2008. Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecological Engineering* 33: 45-53.
- Braeckevelt, M., H. Rokadia, G. Imfeld, N. Stelzer, H. Paschke, P. Kusch, M. Kastner, H. H. Richnow, and S. Weber. 2007. Assessment of in situ biodegradation of monochlorobenzene in contaminated groundwater treated in a constructed wetland. *Environmental Pollution* 148: 428-437.
- Bueno, M., M. F. Fillat, R. J. Strasser, R. Maldonado-Rodriguez, N. Marina, H. Smienk, C. Gomez-Moreno, and F. Barja. 2004. Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena* - Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP(+) reductase. *Environmental Science and Pollution Research* 11: 98-106.
- Burken, J. G., and J. L. Schnoor. 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science & Technology* 32: 3379-3385.
- Chaudhry, G. R., and S. Chapalamadugu. 1991. BIODEGRADATION OF HALOGENATED ORGANIC-COMPOUNDS. *Microbiological Reviews* 55: 59-79.
- Chaudhry, Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta, and E. J. Joner. 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 12: 34-48.

- Clarke, K. R. 1993. NONPARAMETRIC MULTIVARIATE ANALYSES OF CHANGES IN COMMUNITY STRUCTURE. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143.
- Cottin, N., and G. Merlin. 2010. Fate of Chlorinated Benzenes in Laboratory Peat and Pozzolana Filters. *Water Air and Soil Pollution* 213: 425-435.
- De Souza, M. L., D. Newcombe, S. Alvey, D. E. Crowley, A. Hay, M. J. Sadowsky, and L. P. Wackett. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 178-184.
- Dray, S., and A. B. Dufour. 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1-20.
- Dunbar, J., S. M. Barns, L. O. Ticknor, and C. R. Kuske. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3035-3045.
- Duthoit, F., J. J. Godon, and M. C. Montel. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3840-3848.
- Edwards, A. W. F. 1971. DISTANCES BETWEEN POPULATIONS ON BASIS OF GENE FREQUENCIES. *Biometrics* 27: 873-&.
- El-Fantroussi, S. 2000. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5110-5115.
- El-Shahawi, M. S., A. Hamza, A. S. Bashammakh, and W. T. Al-Saggaf. 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80: 1587-1597.
- Fathepure, B. Z., J. P. Nengu, and S. A. Boyd. 1987. ANAEROBIC-BACTERIA THAT DECHLORINATE PERCHLOROETHENE. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2671-2674.
- Feidieker, D., P. Kampfer, and W. Dott. 1995. FIELD-SCALE INVESTIGATIONS ON THE BIODEGRADATION OF CHLORINATED AROMATIC-COMPOUNDS AND HCH IN THE SUBSURFACE ENVIRONMENT. *Journal of Contaminant Hydrology* 19: 145-169.
- Field, J. A., and R. Sierra-Alvarez. 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation* 19: 463-480.
- Frische, K., J. Schwarzbauer, and M. Ricking. 2010. Structural diversity of organochlorine compounds in groundwater affected by an industrial point source. *Chemosphere* 81: 500-508.
- Gerhardt, K. E., X. D. Huang, B. R. Glick, and B. M. Greenberg. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176: 20-30.
- Gish, W., and C. Vogt. 2010. Stereo Coding with MVC. *Smpte Motion Imaging Journal* 119: 56-61.
- Gomez-Hermosillo, C., J. H. Pardue, and D. D. Reible. 2006. Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments. *Environmental Science & Technology* 40: 3229-3236.
- Grayston, S. J., S. Q. Wang, C. D. Campbell, and A. C. Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 369-378.
- Gury, J., L. Zinger, L. Gielly, P. Taberlet, and R. A. Geremia. 2008. Exonuclease activity of proofreading DNA polymerases is at the origin of artifacts in molecular profiling studies. *Electrophoresis* 29: 2437-2444.
- Kidd, P. S., A. Prieto-Fernandez, C. Monterroso, and M. J. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil* 302: 233-247.
- Kindt, R., and Coe, R. 2005. Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. *World Agroforestry Centre* 92: 9059-179.

- Kirk, J. L., J. N. Klironomos, H. Lee, and J. T. Trevors. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133: 455-465.
- Kozdroj, J., and J. D. van Elsas. 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1405-1417.
- Krutz, L. J., C. A. Beyrouty, T. J. Gentry, D. C. Wolf, and C. M. Reynolds. 2005. Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 41: 359-364.
- Kuiper, I., E. L. Lagendijk, R. Pickford, J. P. Derrick, G. E. M. Lamers, J. E. Thomas-Oates, B. J. J. Lugtenberg, and G. V. Bloemberg. 2004. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular Microbiology* 51: 97-113.
- Lal, R., G. Pandey, P. Sharma, K. Kumari, S. Malhotra, R. Pandey, V. Raina, H. P. E. Kohler, C. Holliger, C. Jackson, and J. G. Oakeshott. 2010. Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 58-+.
- Langergraber, G., and R. Haberl. 2001. Constructed wetlands for water treatment. *Minerva Biotechnologica* 13: 123-134.
- Lipman, D. J., S. F. Altschul, and J. D. Kececioglu. 1989. A TOOL FOR MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 4412-4415.
- Lorah, M. M., and M. A. Voytek. 2004. Degradation of 1,1,2,2-tetrachloro ethane and accumulation of vinyl chloride in wetland sediment microcosms and in situ porewater: biogeochemical controls and associations with microbial communities. *Journal of Contaminant Hydrology* 70: 117-145.
- Ma, X. M., and J. G. Burken. 2002. VOCs fate and partitioning in vegetation: Use of tree cores in groundwater analysis. *Environmental Science & Technology* 36: 4663-4668.
- Ma, X. M., and M. M. Havelka. 2009. Phytotoxicity of Chlorinated Benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environmental Toxicology* 24: 43-48.
- Ma, Y., M. N. V. Prasad, M. Rajkumar, and H. Freitas. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29: 248-258.
- Macek, T., M. Mackova, and J. Kas. 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18: 23-34.
- Manickam, N., M. Mau, and M. Schlomann. 2006. Characterization of the novel HCH-degrading strain, *Microbacterium* sp ITRC1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 580-588.
- Manickam, N., R. Misra, and S. Mayilraj. 2007. A novel pathway for the biodegradation of gamma-hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp strain ICH12. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1468-1478.
- Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, D. Dymock, and W. G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA (vol 64, pg 795, 1998). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2333-2333.
- Matsumoto, E., Y. Kawanaka, S. J. Yun, and H. Oyaizu. 2009. Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 205-216.
- McGill, B. J., R. S. Etienne, J. S. Gray, D. Alonso, M. J. Anderson, H. K. Benecha, M. Dornelas, B. J. Enquist, J. L. Green, F. L. He, A. H. Hurlbert, A. E. Magurran, P. A. Marquet, B. A. Maurer, A. Ostling, C. U. Soykan, K. I. Ugland, and E. P. White. 2007. Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. *Ecology Letters* 10: 995-1015.

- Megharaj, M., B. Ramakrishnan, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, and R. Naidu. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International* 37: 1362-1375.
- Miglioranza, K. S. B., J. E. A. de Moreno, and V. J. Moreno. 2004. Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water Research* 38: 1765-1772.
- Miya, R. K., and M. K. Firestone. 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality* 30: 1911-1918.
- Monferran, M. V., D. A. Wunderlin, J. Nimptsch, and S. Pflugmacher. 2007. Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68: 2073-2079.
- Mrozik, A., Z. Piotrowska-Seget, and S. Labuzek. 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* 12: 15-25.
- Muratova, A. Y., T. V. Dmitrieva, L. V. Panchenko, and O. V. Turkovskaya. 2008. Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 10: 486-502.
- Myers, E. W. 1996. Approximate matching of network expressions with spacers. *Journal of Computational Biology* 3: 33-51.
- Nawab, A., A. Aleem, and A. Malik. 2003. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to gamma-HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology* 88: 41-46.
- Needleman, P., and C. D. Wunsch. 1970. A GENERAL METHOD APPLICABLE TO SEARCH FOR SIMILARITIES IN AMINO ACID SEQUENCE OF 2 PROTEINS. *Journal of Molecular Biology* 48: 443-46.
- Nestler, H., B. Kiesel, S. R. Kaschabek, M. Mau, M. Schlomann, and G. U. Balcke. 2007. Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. *Biodegradation* 18: 755-767.
- Nie, M., X. D. Zhang, J. Q. Wang, L. F. Jiang, J. Yang, Z. X. Quan, X. H. Cui, C. M. Fang, and B. Li. 2009. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2535-2542.
- Nishino, S. F., G. C. Paoli, and J. C. Spain. 2000. Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2139-2147.
- Oksanen, J. 2004. Package 'vegan'. [1.7-24] University of Oulu. Oulu, FI.
- Oksanen, J., R. Kindt, P. Legendre, B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, and H. Wagner. 2009. vegan: Community Ecology Package. <http://cran.r-project.org/>.
- Paradis, E., J. Claude, and K. Strimmer. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.
- Peres-Neto, P. R., and D. A. Jackson. 2001. How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* 129: 169-178.
- Phillips, T. M., A. G. Seech, H. Lee, and J. T. Trevors. 2005. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16: 363-392.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Rapp, P., and L. H. E. Gabriel-Jurgens. 2003. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology-Sgm* 149: 2879-2890.
- Ricking, M., and J. Schwarzbauer. 2008. HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin, Germany. *Environmental Chemistry Letters* 6: 83-89.
- Ruiz-Rueda, O., S. Hallin, and L. Baneras. 2009. Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *Fems Microbiology Ecology* 67: 308-319.

- Ryan, P. R., E. Delhaize, and D. L. Jones. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 527-560.
- Schmalenberger, A., F. Schwieger, and C. C. Tebbe. 2001. Effect of primers hybridizing to Different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3557-3563.
- Schröder, P., J. Navarro-Avino, H. Azaizeh, A. G. Goldhirsh, S. DiGregorio, T. Komives, G. Langergraber, A. Lenz, E. Maestri, A. R. Memon, A. Ranallill, L. Sebastiani, S. Smrcek, T. Vanek, S. Vuilleumier, and F. Wissing. 2007. Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 14: 490-497.
- Schwitzguebel, J. P., S. Aubert, W. Grosse, and F. LTURNUS. 2002. Sulphonated aromatic pollutants - Limits of microbial degradability and potential of phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 9: 62-72.
- Shahnavaz B. 2009. PhD - University Joseph Fourier (Grenoble). Communautés bactériennes de sols alpins et filtres environnementaux. p184
- Sharma, A., and M. B. Rehman. 2009. Laboratory scale bioremediation of diesel hydrocarbon in soil by indigenous bacterial consortium. *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 766-769.
- Shaw, L. J., and R. G. Burns. 2003. Biodegradation of organic pollutants in the rhizosphere, pp. 1-60. *In* A. I. Laskin, J. W. Bennett and G. M. Gadd [eds.], *Advances in Applied Microbiology*, Vol 53.
- Singh, N. 2003. Enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers in rhizosphere soil of *Kochia* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 775-782.
- Sinha, S. 2002. Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46: 281-288.
- Stursa, P., O. Uhlik, V. Kurzawova, L. Kochankova, T. Macek, and M. Mackova. 2009. Rhizosphere bacteria and their role in degradation of PCB. *Febs Journal* 276: 184-184.
- Taghavi, S., C. Garafola, S. Monchy, L. Newman, A. Hoffman, N. Weyens, T. Barac, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2009. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 748-757.
- Tchelet, R., R. Meckenstock, P. Steinle, and J. R. van der Meer. 1999. Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. *Biodegradation* 10: 113-125.
- Toyama, T., M. Murashita, K. Kobayashi, S. Kikuchi, K. Sei, Y. Tanaka, M. Ike, and K. Mori. 2010a. Acceleration of Nonylphenol and 4-tert-Octylphenol Degradation in Sediment by *Phragmites australis* and Associated Rhizosphere Bacteria. *Environmental Science & Technology* 45: 6524-6530.
- Toyama, T., N. Momotani, Y. Ogata, Y. Miyamori, D. Inoue, K. Sei, K. Mori, S. Kikuchi, and M. Ike. 2010b. Isolation and Characterization of 4-tert-Butylphenol-Utilizing *Sphingobium fuliginis* Strains from *Phragmites australis* Rhizosphere Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6733-6740.
- Toyama, T., T. Furukawa, N. Maeda, D. Inoue, K. Sei, K. Mori, S. Kikuchi, and M. Ike. 2011. Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudate interactions. *Water Research* 45: 1629-1638.
- Toyama, T., Y. Sato, D. Inoue, K. Sei, Y. C. Chang, S. Kikuchi, and M. Ike. 2009. Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108: 147-150.
- Van Dongen, S. 2008. Graph clustering via a discrete uncoupling process. *Siam Journal on Matrix Analysis and Applications* 30: 121-141.

- Verma, A., and M. K. K. Pillai. 1991. Bioavailability of soil-bound residues of DDT and hch to certain plants. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 347-351.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73: 1163-1172.
- Vijgen, J., P. C. Abhilash, Y. F. Li, R. Lal, M. Forter, J. Torres, N. Singh, M. Yunus, C. G. Tian, A. Schaffer, and R. Weber. 2010. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 152-162.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261-5267.
- Whyte, L. G., T. H. M. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C. W. Greer, and J. B. van Beilen. 2002. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5933-5942.
- Wood, T. K. 2008. Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 572-578.
- Zacharias, B., E. Lang, and H. H. Hanert. 1995. Biodegradation of chlorinated aromatic-hydrocarbons in slow sand filters simulating conditions in contaminated soil - pilot-study for in-situ cleaning of an industrial site. *Water Research* 29: 1663-1671.
- Zhang, J. Y., W. Zhao, J. Pan, L. M. Qiu, and Y. M. Zhu. 2005. Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environment International* 31: 855-860.
- Zinger, L., J. Gury, F. Giraud, S. Krivobok, L. Gielly, P. Taberlet, and R. A. Geremia. 2007. Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: Toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial Ecology* 54: 203-216.
- Zumstein, E., R. Moletta, and J. J. Godon. 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2: 69-78.

Discussion et perspectives

Discussion générale

Les technologies d'écoremédiation trouvent une application à l'heure actuelle de plus en plus fréquente car elles répondent à une volonté sociétale de restauration et/ou préservation des écosystèmes ainsi qu'à des besoins de protection humaine en termes de santé publique. Afin d'obtenir des technologies de plus en plus performantes, la compréhension des mécanismes physiologiques, biochimiques ou encore écologiques de l'écoremédiation, sont nécessaires afin d'apporter de nouvelles solutions ou d'augmenter le rendement de remédiation des systèmes. Le travail de recherche présenté ici porte sur la décontamination d'eaux polluées par des organochlorés. L'étude de phytoremédiation avait pour objectifs d'une part, (i) d'améliorer les connaissances sur la réaction des plantes sélectionnées pour ces technologies, (ii) de comprendre les différents mécanismes physiologiques entrant en jeu et (iii) d'évaluer le comportement dynamique des populations microbiennes de la rhizosphère sous pression chimique d'organochlorés (OCs).

Connaissant les caractéristiques physico-chimiques des composés organiques volatiles (COVs) de type organochlorés (MCB, DCB, TCB, γ HCH), les processus de phytoremédiation optimums en zone humide, correspondent à un écoulement subsurfacique (SSFW, SubSurface Flow Wetland) (Ma and Havelka 2009, Ma and Burken 2002, Braeckevelt et al. 2007 Imfeld et al. 2009). Dans cette technologie, l'eau contaminée est infiltrée directement dans le support organique afin de limiter un contact avec l'atmosphère. Les mécanismes physiques, chimiques et biologiques mis en jeux correspondent à (**Fig 61**): **(1)** l'adsorption des composés organiques sur le complexe argilo-humique du support, **(2)** la séquestration et/ou la dégradation microbienne au niveau du sol et de la rhizosphère, **(3)** l'absorption des OCs et des éventuels produits de dégradation par les racines, **(4)** le transfert des OCs *via* la systémie xylémienne, vers les parties aériennes de la plante et **(5)** potentiellement la phytovolatilisation des composés métabolisés ou non (Susarla et al. 2002, Imfeld et al. 2009). Le devenir des molécules OCs au sein d'un système SSFW planté de macrophytes, *Phragmites australis*, est schématisé **figure 30**. Les différentes étapes numérotées permettent de discuter plus précisément sur le fonctionnement et les processus impliqués dans ce système de remédiation.

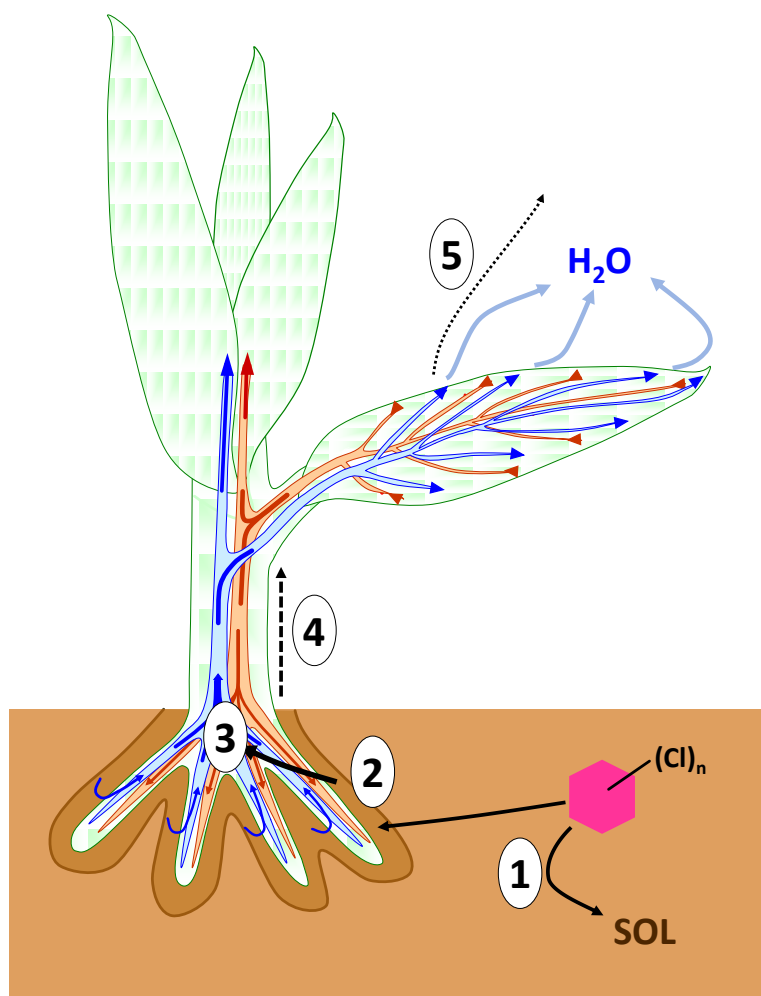


Figure 61 : Les différents processus impliqués dans la phytoremédiation d'une matrice contaminée par des OCs. En bleu, systémie xylémienne et en rouge, la systémie phloémienne.

① Devenir des OCs dans le sol :

D'après Jury et al. (1983), la durée et l'intensité de la volatilisation des composés organiques dans des sols humiques dépendent majoritairement de la **constante de Henry (kH)**. Un composé organique est considéré volatil lorsque $kH \gg 0,0646 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Dans le cas des OCs étudiés, les constantes de Henry présentent les valeurs dans l'ordre croissant : $0,355 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (γHCH), $101\text{-}144 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (TCB), $152\text{-}294 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (DCB) et $315\text{-}345 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (MCB) (**Tableau 3**). Selon cette classification (Jury et al. 1983), les quatre OCs sont qualifiées de **volatiles ou semi-**

volatiles. Cependant, d'autres facteurs sont à prendre en compte tels que, la pression de vapeur saturante, le coefficient de partage $\log K_{oc}$, la solubilité (**tableau 1 et 3 cf. Introduction**) ainsi que la constante de Henry, pour déterminer la volatilité ou non d'une molécule à partir d'un sol/sédiment (Bedos et al., 2002).

La séquestration des molécules organiques dans le sol dépend fortement de leur coefficient de partage sol/carbone ($\log K_{oc}$). Ce paramètre étant largement corrélé à la mobilité des molécules dans le sol. Ce coefficient de partage est fortement dépendant de la lipophilie des molécules. Dans notre cas l'ordre de grandeur des coefficients de partage des OCs est $TCB \geq \gamma HCH > DCB > MCB$ ($\log K_{oc}$: TCB [3,3 – 3,66] ; γHCH [3 – 3,57] ; DCB [2,44 – 3,26] et MCB [1,92 – 2,7]). Au vu de ces valeurs de partition sur la matière organique, les OCs sont retenus sur la matière organique du sol conduisant à une séquestration de ces produits sur le support (Zhang et al., 2011). Ce phénomène est un facteur limitant fortement la volatilisation (Cottin and Merlin 2010). Par ailleurs, la réversibilité de l'adsorption rend les OCs disponibles dans le temps pour des dégradations de type microbien ou par l'action de la pédofaune présente (Buyuksonmez et al. 1999, Phillips et al. 2005). Certaines études ont démontré qu'une minéralisation complète des OCs pouvait être réalisée au niveau du sol en aérobiose (Guerin 1999, Phillips et al. 2004, Sagar and Singh 2011). Dans l'eau libre du sol les molécules OCs parentes et métabolites pourront alors être recherchés et trouvés.

② *Les OCs et la rhizosphère*

Lorsque les composés organiques chlorés sont solubilisés dans l'eau libre du sol, ils peuvent se retrouver à proximité de la rhizosphère grâce au mouvement d'eau créé par le pouvoir de succion exercé par le couvert végétal (Rios et al. 2009, Borin et al. 2011). Dès lors la solution du sol contenant les OCs (majoritairement sous forme biodisponible) est en contact avec la microflore bactérienne et fongique de la rhizosphère et les tissus racinaires des plantes, en particulier les poils absorbants. Nos recherches ont clairement démontré que les eaux contaminées en OCs peuvent agir sur la structure microbienne de la rhizosphère et ceci de façon corrélée à un gradient de concentration (**Chapitre IV**). La pression chimique de type OCs apparaît comme un événement fortement sélectif des communautés bactériennes alors que les communautés fongiques ne montrent pas de différences significatives dans leur structuration quelle que soit la dose d'OCs appliquée.

Les communautés fongiques semblent tolérantes à ce type de molécules aromatiques chlorées (Phillips et al. 2005). Par contre, les communautés bactériennes montrent une adaptation particulière à cette contrainte chimique : (i) certaines souches sensibles aux OCs disparaissent ou deviennent peu représentées dans la rhizosphère et (ii) certaines souches précédemment faiblement représentées deviennent abondantes en présence d'OCs démontrant leur caractère opportuniste (e.g., *Firmicutes*, ...). Dès lors la flore rhizosphérique se constitue majoritairement (en termes d'abondance) de souches bactériennes tolérantes aux OCs. Certaines sont même décrites comme biodégradante (dans les genres *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* ; (Whyte et al. 2002, Rapp and Gabriel-Jurgens 2003, Phillips et al. 2005, Wood 2008). La microflore rhizosphérique montre alors un pouvoir non négligeable de dégradation des OCs comme décrit précédemment avec d'autres espèces végétales (Kidd et al. 2008, Slater et al. 2011). Certaines souches telles que *Bacillus*, *Rhodococcus* présentent dans la rhizosphère des *Phragmites* pourraient jouer sur la biodisponibilité des OCs en produisant des biosurfactants (Taghavi et al. 2009, Becerra-Castro et al. 2011, Megharaj et al. 2011). La biodisponibilité améliorée des OCs est une étape majeure de remédiation puisque elle permet (i) d'augmenter l'absorption de ces composés par les bactéries et/ou les plantes, et (ii) de favoriser leur biodégradation. L'analyse moléculaire des populations bactériennes montrent que parmi les souches abondantes identifiées, des bactéries décrites comme OC-biodégradantes et comme productrices de biosurfactants sont présentes en conditions d'exposition aux OCs. La fonctionnalité de la rhizosphère montre une adaptation des communautés bactériennes en fonction de la pression OCs. Cependant, cette adaptation peut aussi être liée à une modification de la nature ou de la quantité des exsudats racinaires permettant de favoriser le développement des souches opportunistes (Corgie et al. 2004, Wenzel 2009). L'interaction plante-microbes-OCs reste tout de même difficile à cerner. Les effets évolutifs dépendants des facteurs environnementaux abiotiques (température, pluviométrie, ...), le temps de contact (âge de la plante,...) et certains effets rétroactifs (interactions antagonistes entre communautés bactériennes, ...) sont autant de facteurs à prendre en compte et qui peuvent influencer les interactions. La rhizosphère des *Phragmites* en présence d'OCs demeure fonctionnelle et semble pouvoir exercer une dégradation effective.

③ Absorption des organochlorés (OCs) par *P. australis*

Pour envisager l'application d'une technique de phytoremédiation, la tolérance des plantes vis-à-vis de la charge polluante est une condition obligatoire. Nos recherches ont permis d'évaluer la phytotolérance des plants de *P. australis* en présence d'OCs (mono- et multi-exposition). Ces résultats sont assez originaux, car peu d'études concernant la toxicité des OCs sur plantes ont été menées (Kong et al. 1998, Calabrese and Baldwin 2002, Ma and Burken 2002, Liu et al. 2003, Liu et al. 2004, Monferran et al. 2007). Nos résultats montrent que des effets toxiques sur les plantes de *P. australis* (**publications 1 et 2**) sont obtenus avec des concentrations en OCs (monoexposition) supérieures à 10mg l⁻¹. Les symptômes relevés au-delà de cette dose, ont été principalement, des inhibitions de croissance et des perturbations morphologiques (épaississement des extrémités racinaires, diminution des ramifications racinaires, chlorose,...). Le suivi de processus correspondants au stress oxydant (ROS, activités enzymatiques POD et GR, peroxydation des lipides) ont démontré que *P. australis* est une plante possédant une activité basale du mécanisme de régulation des ROS suffisant pour gérer ce type de stress engendré par des expositions aux OCs. L'amplitude du stress oxydant semble être corrélée au degré de chloration de chaque composé, soit MCB<DCB<TCB<γHCH. Cette même corrélation a été décrite chez une algue *Selenastrum capricornutum* (MCB<TCB<HCB) (Kong et al. 1998). L'origine du stress oxydant généré par les OCs pourrait être liée à la libération d'atomes de chlore. Des études ont démontré que des composés aromatiques chlorés pouvaient être détoxiqués par des peroxydases et des monooxygénases P450 libérant des Cl⁻ dans l'espace intracellulaire (Talano et al. 2010). Par ailleurs, H₂O₂ et O₂^{•-} pourraient déchlorer les OCs générant des radicaux secondaires (Sinha 2002) (Pennathur et al. 2010). Les Cl⁻ et les radicaux ainsi générés expliqueraient l'induction du stress oxydant croissant en fonction du degré de chloration des OCs. En se basant sur ces critères physiologiques, les concentrations NOEC_{7jours} (No Observed Effect Concentration) pour chaque OCs sont : 0,8 mg l⁻¹ MCB, 0,8 mg l⁻¹ DCB, 10 mg l⁻¹ TCB et 0,7 mg l⁻¹ γHCH. Ces valeurs sont cohérentes avec des études réalisées sur d'autres espèces végétales : une algue (cyanobactérie (*Anabaena*)) (Calamari et al. 1983, Babu et al. 2001) et des plantes terrestres (*Hordeum vulgare* L., *Brassica* sp., *Phaseolus vulgaris* L.) (Pereira et al. 2010). Les NOEC_{7jours} pour chaque OCs sont beaucoup plus élevées que celles retrouvées dans l'environnement. Les concentrations environnementales des OCs

sont en moyenne 1 000 à 300 000 fois plus faibles que les NOEC_{7jours} mesurées en laboratoire.

In situ, les plantes sont exposées à des multipollutions (Feidieker et al. 1995, Meharg et al. 2000, Lal et al. 2010) et dans notre cas des mélanges complexes d'OCs. Nous avons démontré que le mélange des OCs provoquait des effets phytotoxiques chez les plantes de *P. australis* avec une action qui semble synergique. Nous avançons l'hypothèse que le mélange d'OCs, métabolisé dans les cellules, libéreraient une quantité plus importante de Cl⁻ ce qui induirait une augmentation des ROS, de radicaux secondaires et de métabolites parfois plus toxiques (chlorophénols) (Sinha 2002, Pennathur et al. 2010); (Wang et al. 1996, Biswas et al. 2010). Cette production supplémentaire d'éléments toxiques causerait des dommages cellulaires plus importants. La NOEC_{7jours} du mélange d'OCs a été mesurée à 0.2 mg l⁻¹ MCB + 0.2 mg l⁻¹ DCB + 2.5 mg l⁻¹ TCB + 0.175 mg l⁻¹ γHCH. Ce mélange est toléré par les plantes de *P. australis* pendant 21 jours sans provoquer d'effets phytotoxiques. Cette NOEC_{7jours} permet d'évaluer un coefficient de risque de l'ordre de 0.07, démontrant que les concentrations environnementales d'OCs ne présentent pas de risque toxique aigu pour ces macrophytes.

Cette phytotolérance peut être liée à des processus performants de détoxification (phases de fonctionnalisation et de conjugaison) et/ou de séquestration des OCs dans les tissus de *P. australis*. Des études antérieures ont préalablement démontré la possible intervention (i) d'une phase I de déchloration, catalysée par des monooxygénases P450 (Ryan et al. 1981, Fonnefister and Kreuz 1990, Loureiro et al. 2010) des peroxydases (Stazi et al. 2001, Jansen et al. 2004, Biswas et al. 2010), des réductases (Magee et al. 2008) ou des déhalogénases (Susarla et al. 2002) et (ii) d'une phase II de conjugaison catalysée par les GSTs et/ou les UGTs (Edwards et al. 2000, Cummins et al. 2011) (Messner et al. 2003, Petroutsos et al. 2007b). Les macrophytes exposées aux OCs montrent des modifications de l'intensité des activités GSTs et UGTs. Dans nos conditions, les activités GST semblent inhibées par les OCs, souvent corrélées avec le degré de chloration des composés : MCB < DCB < TCB < γHCH. Par contre, les OCs induisent les activités UGT différemment en fonction du type d'organe. Les OCs ainsi que leur métabolites de phase I, semblent être pris en charge par les enzymes de types UGTs. Des études de Petroutsos et al. (2007b) ont permis de mettre en évidence cette voie de métabolisation de phase II. Chez des algues, *Tetraselmis marina*, la conjugaison des

formes hydroxylées du DCB et du TCB catalisée par les UGTs a été démontrée. Dans notre cas il est alors possible d'envisager la même voie de conjugaison. En multiexposition, l'induction des activités UGT, se localisent essentiellement au niveau des feuilles. Suite à ces observations d'induction significative d'activités UGTs dans l'ensemble des organes de la plante, il semblerait que *P. australis* soit capable de prendre en charge les OCs et d'induire un mécanisme de défense efficace.

Les capacités d'absorption des OCs par la plante, *P. australis*, ont mis en évidence plusieurs processus d'absorption. L'absorption des OCs par les racines (vivantes ou mortes) montre une forte corrélation entre la lipophilie de chacune des molécules et le facteur de concentration dans les racines (RCF) (z-test ; $p < 0.0001$; $R^2 = 0.956$). Ces résultats peuvent s'expliquer par la partition des OCs dans les espaces lipidiques localisés dans l'hypoderme et l'exoderme des tissus racinaires des macrophytes (Soukup et al. 2007). Sur plante entière, une absorption plus importante est observée en fonction de la solubilité des molécules. D'une façon générale, les plantes de *P. australis* sont capables d'extraire les OCs, dès lors qu'ils se retrouvent sous forme solubilisée dans l'eau et à proximité des parties racinaires. Les OCs les moins volatiles pénètrent plus facilement dans la plante et après 28 jours d'exposition, l'absorption du DCB, TCB et du γ HCH est respectivement de $0.25 \pm 0.1\%$, $1.14 \pm 0.19\%$ et $15.6 \pm 0.54\%$. L'absorption des OCs par la plante entière montre une bonne corrélation entre le facteur de concentration (PCF) et leur solubilité dans l'eau (z-test ; $p = 0.0058$, $R^2 = 0.810$), ainsi que leur pression de volatilisation (z-test ; $p = 0.009$, $R^2 = 0.783$). L'absorption des OCs par la plante entière est un phénomène complexe (i) de partition dans les zones lipophiles, expliquant la concentration importante observée dans les organes souterrains, (ii) d'absorption *via* le flux d'eau entrant par les racines et circulant jusqu'aux feuilles grâce au phénomène transpiratoire et (iii) d'absorption non démontrée, d'une diffusion passive de gaz par le système aéroenchyme. Les organes souterrains (racines et rhizomes) accumulent entre 80-90% de la quantité des OCs absorbés par la plante.

④ Translocation des OCs et ⑤ évaluation de la phytovolatilisation

Les mécanismes de translocation des OCs dans la plante ont été décrits par une série de modèles mathématiques (Paterson et al. 1990, Sicbaldi et al. 1997, Pardue 2002, Ma and Burken 2003, Collins et al. 2006, Satchivi et al. 2006, Dettenmaier et al. 2009) : le coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$), la solubilité dans l'eau (SW) et la pression de vapeur (V_p) de chaque OC. Ainsi, nous avons montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la translocation de chaque OC et le $\log K_{ow}$, soit plus la molécule est lipophile, moins son taux de transfert des racines vers les parties foliaires est important. Ce résultat corrobore la précédente observation de concentration des OCs en fonction de leur lipophilie dans les parties souterraines (espaces lipidiques) : plus ils sont lipophiles plus ils se retrouvent concentrés dans les espaces lipidiques. Par contre, de fortes corrélations existent entre la solubilité des OCs et leur transfert (TF) des racines jusqu'aux feuilles (z-test, $p = 0.038$, $R^2 = 0.69$). Cependant à 28 jours, nous avons obtenus une corrélation négative entre le facteur de translocation dans le flux transpiratoire des OCs ($TSCF_{28\text{jours}}$, correspondant au transfert des molécules dans la sève brute) et leur solubilité SW (z-test ; $p = 0.0071$, $R^2 = -0.8$). Ces résultats ne concordent pas avec nos résultats à 7 jours d'exposition et avec d'autres études (Paterson et al. 1990, Collins et al. 2006), qui montrent que plus les composés organiques sont solubles, plus ils sont susceptibles d'être transportés *via* le flux transpiratoire xylémien. Nous supposons que ce transfert dans les *Phragmites* est modifié par (i) la métabolisation des OCs dans les racines et rhizomes et (ii) le volume molaire de chaque OC et de leurs métabolites respectifs. Le seul transfert par voie xylémienne ne semble pas expliquer la totalité de la translocation mesurée des OCs. Les études de (Paterson et al. 1990) suggèrent que la pression de vapeur puisse être impliquée dans les phénomènes complexes de translocation. Nous observons la corrélation suivante : plus la volatilité des molécules est élevée, plus leur translocation (TF) est importante (z-test ; $p = 0.042$, $R^2 = 0.834$). De plus, les espèces aquatiques telles que *P. australis*, possèdent un système d'air circulant passant par les racines jusqu'aux parties supérieures de la plante, pour se libérer dans l'atmosphère (Brix 1994). Dans notre cas il n'est donc pas exclu de penser, que les composés volatiles empruntent ce même système d'air circulant à travers les tissus aérochymateux (Pardue 2002, Ma and Burken 2003). La phytovolatilisation mesurée reste relativement faible pour l'ensemble des OCs ($< 0.09\%$). Cependant, une forte

corrélation a été établie entre la V_p et le facteur de phytovolatilisation (z-test ; $p = 0.0008$, $R^2 = 0.905$).

Les macrophytes, *P. australis*, montrent une phytoextraction non négligeable des OCs dont la majorité de la quantité absorbée reste localisée au niveau des racines et des rhizomes (80-90%).

Quel est l'intérêt d'utiliser des plantes dans la remédiation des eaux contaminées aux OCs?

Les filtres plantés à macrophytes sont couramment utilisés en phytoremédiation. Dans notre cas de remédiation d'eaux contaminés aux OCs, nous avons démontré que les plantes pouvaient tolérer ce type de multipollution (Chapitre I et III) et absorber ces polluants de manière non négligeable (jusqu'à 15% sur 28 jours dans nos conditions de laboratoire ; Chapitre II). La nécessité d'utiliser ces plantes dans le fonctionnement global de la remédiation des OCs se résume en plusieurs aspects positifs, voire indispensables à l'efficacité du système.

Les plantes permettent de limiter la volatilisation des OCs à partir du substrat. Des études précédentes ont démontré que la perte des OCs par volatilisation était réduite en présence d'un couvert végétal (Abhilash and Singh, 2002 ; Calvelo Pereira et al., 2008). Le réseau racinaire permettrait de maintenir dans la rhizosphère une quantité plus importante d'OCs qu'en absence de végétaux (Abhilash and Singh, 2002) et d'assurer ainsi, une cohésion forte du sol. La densité foliaire de surface permettrait également d'assurer, une atmosphère à la surface du sol avec une température plus faible et un degré d'humidité plus élevé, protégeant le sol de l'érosion éolienne et hydrique. Cet ensemble limiterait fortement les contaminations atmosphériques par volatilisation ou co-volatilisation (aérosols...). Par ailleurs, certains auteurs ont démontré que les plantes peuvent filtrer l'air ambiant et notamment absorber par voie foliaire des contaminants volatiles et semi-volatiles (Trapp and Matthies 1995, Wilson and Meharg 2003, Steyaert et al. 2009, Mikes et al. 2009) ont mis en évidence une absorption foliaire des organochlorés. Ainsi, les feuilles pourraient assurer une dépollution supplémentaire de l'air ambiant.

Par ailleurs, les macrophytes présentent un réseau racinaire souvent dense et volumineux. Les racines peuvent structurer le support solide, par leur croissance et leur ramification formant ainsi un réseau qui permet (i) d'augmenter la surface de contact avec l'eau du sol et les polluants, (ii) de créer des zones aérobies en profondeur du support et (iii) de diriger les flux d'eau du sol vers la rhizosphère (Abhilash and Singh 2009). Le réseau racinaire en contact avec les OCs biodisponibles peut ainsi assurer soit une adsorption ou une absorption des OCs sur les tissus extérieurs et/ou internes (Chen et al. 2007), soit une absorption comme nous l'avons démontré précédemment (chapitre II).

Le fonctionnement de la rhizosphère est très complexe et s'établit autour de substances libérées par les plantes (exsudats : sucres, acides aminées, enzymes,...). Ces exsudats sont généralement constitués de composés courants mais dont l'assemblage quantitatif et qualitatif est spécifique à chaque type de plante. Certains composés exudés sont capables de jouer le rôle de biosurfactants en situation de rendre les polluants chlorés (e.g. les chlorophenols), biodisponibles pour la plante (Bert et al. 2009). Par ailleurs, certaines enzymes exudées par les racines dans le milieu environnant sont capables d'assurer une detoxication des polluants organiques (Siciliano et al. 1998, Alkorta and Garbisu 2001). La spécificité des exsudats racinaires détermine la présence d'une microflore particulière. Ainsi, les plantes permettent de maintenir une microflore diversifiée au niveau du sol qu'elle soit anaérobie ou aérobie. Nous avons démontré que la flore bactérienne de la rhizosphère des macrophytes *Phragmites* pouvait s'adapter à une exposition complexe d'OCs (Chapitre IV), soit par une croissance des communautés opportunistes, soit par un maintien des souches tolérantes à cette exposition. Par conséquent, une rhizodégradation peut être envisagée au niveau de la microflore rhizosphérique (Singh 2003, Liu et al. 2007, Kidd et al. 2008). Cette étape permettrait (i) d'assurer une remédiation efficace vis-à-vis des OCs, (ii) de favoriser la phytotolérance et (iii) de modifier la biodisponibilité des OCs dans la phase liquide du sol voire de faciliter la phytoextraction des OCs et de leurs métabolites.

Les *Phragmites* peuvent absorber les OCs dont 80 à 90% de la quantité absorbée est localisée dans les parties souterraines (Chapitre II). Enfin, une biodégradation conjointe peut être envisagée entre les cellules végétales (ou phytodégradation) et les endophytes présentes (Jha and Kumar 2007, Dolinar and Gaberscik 2010). Ainsi, les macrophytes peuvent aussi assurer une diversité des communautés microbiennes

endophytiques. Ces souches particulières pourraient être sélectionnées par la pression d'exposition aux OCs, comme cela est démontré pour d'autres espèces végétales traitées à des polluants organiques chlorés (Weyens et al. 2010, Becerra-Castro et al. 2011).

L'ensemble de tous ces critères sont positifs et justifient fortement l'utilisation des plantes dans les technologies de remédiation de matrices polluées aux OCs. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux capacités épuratrices de *Phragmites australis*. Cependant le suivi de zones humides construites pour traiter les OCs devraient pouvoir montrer l'adaptation écologique de diverses macrophytes qui assureraient de ce fait une biodiversité végétale ainsi qu'une biodiversité microbienne associée à leur rhizosphère. L'ensemble pourrait générer un système vivant complexe d'une grande efficacité dans la dégradation des OCs, pouvant aller jusqu'à la minéralisation des polluants récalcitrants tels que ceux utilisés dans ce travail.

Perspectives

Cette étude a permis d'aborder l'effet d'un mélange de petits polluants organiques sur les plantes de type macrophyte (phytotoxicité/phytotolérance) jusqu'à l'exploration des communautés microbiennes de la rhizosphère, ce que peu d'études ont jusqu'alors traité. Notre démarche de laboratoire se voulait être une première approche, dans une marche vers un réalisme de terrain. Ce travail a permis de comprendre, au moins en partie, les mécanismes impliqués dans la phytoremédiation des OCs.

Phytotolérance et temps d'exposition aux OCs

Les réponses enzymatiques de détoxification ont révélé des différences d'induction des UGTs entre les cas de mono-exposition et ceux de multi-exposition après un temps fixe de 7 jours. Une des propositions suggérée serait de faire varier le paramètre temps d'exposition afin de mieux comprendre les mécanismes d'induction de détoxification. De cette façon, il serait alors possible (i) de visualiser l'induction temporelle des UGTs sur des temps plus ou moins long, (ii) de mettre en avant quelles activités enzymatiques (GSTs ou UGTs) sont induites ou inhibées en premier, et (iii) de visualiser la succession des activités GSTs et UGTs entre les organes de la plante. Une meilleure compréhension de la chronologie de ces mécanismes est un maillon essentiel dans l'analyse de la phytotolérance associée aux capacités de phytodégradation.

La nature du substrat

Notre étude avait pour but d'aborder et de comprendre les différents mécanismes intervenant dans le processus de phytoremédiation des OCs. Pour cela, nous nous sommes affranchi d'un problème limitant la biodisponibilité des polluants pour la plante, en réalisant pratiquement toutes nos expériences en milieu hydroponique (élimination du substrat sol). De cette façon nous évitons les problèmes d'adsorption

des OCs sur un éventuel support organique, avec un contrôle facile de la mesure de la concentration dans l'eau. Dans une étape ultérieure il s'agira de mesurer le niveau de rétention des OCs sur le support organique. La nature du substrat, est un critère non négligeable, faisant varier les possibilités d'absorption et d'accessibilité des polluants pour la plante. Aussi une gamme de supports constitués d'une part de sable, de tourbe et d'un degré croissant de matières organiques permettrait d'évaluer la part d'adsorption des OCs, en mono-exposition mais aussi en multi-exposition où l'association de plusieurs composés organiques serait susceptible de modifier ce phénomène adsorption/désorption.

Etude des communautés fongiques de la rhizosphère

Nos expériences sur la rhizosphère ont révélé une communauté fongique capable de tolérer les expositions aux OCs. Cette observation s'est traduite par une répartition aléatoire des différents profils moléculaires des communautés fongiques issues de chaque échantillon (sans et avec traitement OCs). De nombreuses études ont décrit la capacité de certaines souches à métaboliser les polluants organiques (Sagar and Singh, 2011 ; Joseph et al., 2010 ; Phillips et al., 2005 ; Marco-Urrea et al., 2009). Il serait alors envisageable dans notre cas, de mettre en évidence ces souches fongiques et de réaliser les mêmes approches d'études moléculaires que pour les communautés bactériennes. La dynamique des populations fongiques apporterait une connaissance sur leur adaptation à la pression chimique et croisée à la dynamique des populations bactériennes permettrait de compléter les données sur la fonctionnalité de la rhizosphère.

Etude des communautés bactériennes de la rhizosphère

Les tests préliminaires de toxicité des OCs sur les souches bactériennes cultivables et cultivées, ont montré des différences de réponse en fonction de la pression chimique appliquée. Il est alors apparue des souches sensibles mais également des souches tolérantes à l'exposition des polluants. La prochaine étape de cette étude, serait de

mettre en évidence les capacités des souches tolérantes à dégrader les OCs. En présence des différents OCs comme unique source de carbone, les souches capables d'utiliser ces polluants verraient leurs colonies s'agrandir et proliférer, traduisant ainsi leurs capacités à les biodégrader. Par ailleurs, des analyses chimiques (HPLC-MS, CPG-MS) pourraient être réalisées en complément, afin de préciser la structure chimique des métabolites. Des expérimentations possibles avec utilisation des ^{14}C -OCs permettraient d'évaluer la rapidité de minéralisation par libération de $^{14}\text{CO}_2$.

Enfin, l'utilisation d'un consortium de bactéries (préalablement sélectionnées pour leur capacité à dégrader les organochlorés), serait alors judicieux afin d'augmenter l'efficacité de bioremédiation par inoculation dans les systèmes plante/rhizosphère.

Capacité épurative du système eau/sol/plante

Chaque compartiment du système de phytoremédiation a été abordé dans ce travail de thèse. **Le système [eau/plante]** a permis de visualiser l'intervention de la plante dans l'absorption des OCs après avoir déterminé les concentrations NOEC et les activités enzymatiques de la plante, en conditions exclusivement hydroponiques.

Le système [sol/plante] a également été abordé par le biais du travail sur la rhizosphère de la plante, permettant de visualiser les souches bactériennes pouvant intervenir dans le processus de phytoremédiation des OCs.

Il est alors possible de visualiser et d'envisager **le système [eau/sol/plante]** par les différentes expériences abordées, qui donnent une image réaliste de l'utilisation de cette technique pour la remédiation de milieux contaminés. Il serait intéressant de compléter l'étude par la mise en place d'un système complet **[eau/sol/plante]** et l'utilisation de molécules OCs radiomarquées ^{14}C pour visualiser le devenir des polluants dans de telles conditions. La microflore jouerait dans ce cas, un rôle important permettant l'absorption des polluants dans la plante sous forme métabolisée ou non. Cette approche aurait pour intérêt, d'élaborer une cartographie du réseau de dégradation des molécules OCs. Des analyses chimiques (HPLC-MS, CPG-MS) s'ajouteraient à cette étude afin de déterminer la nature des composés dérivés.

Références bibliographiques

- Aajoud, A., P. Ravanel, and M. Tissut. 2003.** Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1347-1352.
- Aajoud, A., M. Raveton, H. Aouadi, M. Tissut, and P. Ravanel. 2006.** Uptake and xylem transport of fipronil in sunflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5055-5060.
- Abhilash, P. C., S. Jamila, V. Singh, A. Singh, N. Singh, and S. C. Srivastava. 2008.** Occurrence and distribution of hexachlorocyclohexane isomers in vegetation samples from a contaminated area. *Chemosphere* 72: 79-86.
- Abhilash, P. C., and N. Singh. 2009.** Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 727-740.
- Abhilash, P. C., and N. Singh. 2010.** *Withania somnifera* Dunal-mediated dissipation of lindane from simulated soil: implications for rhizoremediation of contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments* 10: 272-282.
- Adebusoye, S. A., F. W. Picardal, M. O. Ilori, O. O. Amund, C. Fuqua, and N. Grindle. 2007.** Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils. *Chemosphere* 66: 1939-1946.
- Adebusoye, S. A., M. O. Ilori, F. W. Picardal, and O. O. Amund. 2008.** Extensive biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1242 and electrical transformer fluid (Askarel) by natural strains of microorganisms indigenous to contaminated African systems. *Chemosphere* 73: 126-132.
- ADEME (2009)** Guide ADEME Traitabilité des sols pollués : Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances, 236 p.
- Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke, and H. Gorisch. 2000.** Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408: 580-583.
- Agnihotri, N. P., V. T. Gajbhiye, M. Kumar, and S. P. Mohapatra. 1994.** organochlorine insecticide residues in ganga river water near Farrukhabad, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 30: 105-112.
- Alfreider, A., C. Vogt, and W. Babel. 2003.** Expression of chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in chlorobenzene-contaminated subsurface samples. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1372-1376.

- Alkorta, I., and C. Garbisu. 2001.** Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* 79: 273-276.
- Allocati, N., L. Federici, M. Masulli, and C. Di Ilio. 2009.** Glutathione transferases in bacteria. *Febs Journal* 276: 58-75.
- Apel, K., and H. Hirt. 2004.** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arienzo, M., E. W. Christen, and W. C. Quayle. 2009.** Phytotoxicity testing of winery wastewater for constructed wetland treatment. *Journal of Hazardous Materials* 169: 94-99.
- Armstrong, J., W. Armstrong, and P. M. Beckett. 1988.** *Phragmites-australis* - a critical-appraisal of the ventilating pressure concept and an analysis of resistance to pressurized gas-flow and gaseous-diffusion in horizontal rhizomes. *New Phytologist* 110: 383-389.
- Armstrong, W., D. Cousins, J. Armstrong, D. W. Turner, and P. M. Beckett. 2000.** Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* 86: 687-703.
- ATSDR. 1993.** Toxicological profiles for 1,4-dichlorobenzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S. department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.
- ATSDR. 1994.** Toxicological Profile for Hexachlorocyclohexanes (HCH). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S. department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.
- Aubertot, J. N., J. S. West, L. Bousset-Vaslin, M. U. Salam, M. J. Barbetti, and A. J. Diggle. 2006.** Improved resistance management for durable disease control: A case study of phoma stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 91-106.
- Babu, G. S., R. K. Hans, J. Singh, P. N. Viswanathan, and P. C. Joshi. 2001.** Effect of lindane on the growth and metabolic activities of cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48: 219-221.
- Bailey, R. 1998.** Global mass balance of hexachlorobenzene. Report to Chemical Manufacturers Association.
- Baker, A. J. M., S. P. McGrath, R. D. Reeves, and J. A. C. Smith. 2000.** Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils.
- Balba, M. H., and J. G. Saha. 1974.** Metabolism of lindane-c-14 by wheat plants grown from treated seed. *Environmental Letters* 7: 181-194.

- Banerjee, S., and R. Goswami. 2010.** GST profile expression study in some selected plants: in silico approach. *Molecular and Cellular Biochemistry* 336: 109-126.
- Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J. V. Colpaert, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2004.** Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22: 583-588.
- Barber, J. L., A. J. Sweetman, D. van Wijk, and K. C. Jones. 2005.** Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment* 349: 1-44.
- Barrie, L., B. Ahier, J. Bottenheim, H. Niki, and J. Nriagu. 1992.** Atmospheric methane and sulfur-compounds at a remote central canadian location. *Atmospheric Environment Part a-General Topics* 26: 907-925.
- Bartels, I., H. J. Knackmuss, and W. Reineke. 1984.** Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *pseudomonas-putida* MT-2 by 3-halocatechols. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 500-505.
- Bartholomew, D. M., D. E. Van Dyk, S. M. C. Lau, D. P. O'Keefe, P. A. Rea, and P. V. Viitanen. 2002.** Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiology* 130: 1562-1572.
- Becerra-Castro, C., P. S. Kidd, A. Prieto-Fernandez, N. Weyens, M. J. Acea, and J. Vangronsveld. 2011.** Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant and Soil* 340: 413-433.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., Gabrielle, B. 2002.** Mass transfer of pesticides into the atmomsphere by volatilization from soils and plants : overview. *Agronomie*, 22, 21-33.
- Belden, J. B., and M. J. Lydy. 2000.** Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2266-2274.
- Belden, J. B., and M. J. Lydy. 2006.** Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 623-629.
- Bert, V., P. Seuntjens, W. Dejonghe, S. Lacherez, H. T. T. Thuy, and B. Vandecasteele. 2009.** Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 745-764.
- Bhatt, P., M. S. Kumar, and T. Chakrabarti. 2009.** Fate and Degradation of POP-Hexachlorocyclohexane. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 39: 655-695.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto, and H. J. Forman. 2008.** Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 10: 1549-1564.

- Biswas, D. K., G. Scannell, N. Akhmetov, D. Fitzpatrick, and M. A. K. Jansen. 2010.** 2,4,6-Trichlorophenol mediated increases in extracellular peroxidase activity in three species of Lemnaceae. *Aquatic Toxicology* 100: 289-294.
- Borin, M., M. Milani, M. Salvato, and A. Toscano. 2011.** Evaluation of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. evapotranspiration in Northern and Southern Italy. *Ecological Engineering* 37: 721-728.
- Bourbouloux, A., P. Shahi, A. Chakladar, S. Delrot, and A. H. Bachhawat. 2000.** Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 13259-13265.
- Bourne, Y., and B. Henrissat. 2001.** Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 593-600.
- Bowles, D., J. Isayenkova, E. K. Lim, and B. Poppenberger. 2005.** Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 254-263.
- Bowles, D., E. K. Lim, B. Poppenberger, and F. E. Vaistij. 2006.** Glycosyltransferases of lipophilic small molecules, pp. 567-597, *Annual Review of Plant Biology*.
- Braeckevelt, M., H. Rokadia, G. Imfeld, N. Stelzer, H. Paschke, P. Kusch, M. Kastner, H. H. Richnow, and S. Weber. 2007.** Assessment of in situ biodegradation of monochlorobenzene in contaminated groundwater treated in a constructed wetland. *Environmental Pollution* 148: 428-437.
- Braeckevelt, M., G. Mirschel, A. Wiessner, M. Rueckert, N. Reiche, C. Vogt, A. Schultz, H. Paschke, P. Kusch, and M. Kaestner. 2008.** Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecological Engineering* 33: 45-53.
- Brazier, M., D. J. Cole, and R. Edwards. 2002.** O-glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Phytochemistry* 59: 149-156.
- Brazier-Hicks, M., and R. Edwards. 2005.** Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 42: 556-566.
- Brazier-Hicks, M., L. A. Edwards, and R. Edwards. 2007.** Selection of plants for roles in phytoremediation: the importance of glucosylation. *Plant Biotechnology Journal* 5: 627-635.
- Breivik, K., J. M. Pacyna, and J. Munch. 1999.** Use of alpha-, beta- and gamma-hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *Science of the Total Environment* 239: 151-163.

- Breivik, K., and F. Wania. 2002.** Evaluating a model of the historical behavior of two hexachlorocyclohexanes in the Baltic sea environment. *Environmental Science & Technology* 36: 1014-1023.
- Breivik, K., and F. Wania. 2003.** Expanding the applicability of multimedia fate models to polar organic chemicals. *Environmental Science & Technology* 37: 4934-4943.
- BRGM/RP – 58609. 2010.** Bureau de Recherches Géologiques et Minières : Rapport FR Juin 2010 «Quelles techniques pour quels traitements – Analyses coûts/bénéfices» : www.brgm.fr
- Briggs, G. G., R. H. Bromilow, and A. A. Evans. 1982.** Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science* 13: 495-504.
- Brix, H. 1994.** Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Water Science and Technology* 29: 71-78.
- Brunsbach, F. R., and W. Reineke. 1994.** Degradation of chlorobenzenes in soil slurry by a specialized organism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 415-420.
- Budavari, S. 1989.** Retrospective and perspectives - a brief look at the evolution of the merck index over 100 years and a preview of future-plans. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 198: 35-CINF.
- Bueno, M., M. F. Fillat, R. J. Strasser, R. Maldonado-Rodriguez, N. Marina, H. Smienk, C. Gomez-Moreno, and F. Barja. 2004.** Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena* - Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP(+) reductase. *Environmental Science and Pollution Research* 11: 98-106.
- Burken, J. G. 2003.** Uptake and metabolism of organic compounds: green- liver model. In *Phytoremediation. Transformation and Control Contaminants*. J. L. Schnoor, Ed., pp. 59-84.
- Buyuksonmez, F., R. Rynk, T. F. Hess, and E. Bechinski. 1999.** Occurrence, degradation and fate of pesticides during composting - Part I: Composting, pesticides, and pesticide degradation. *Compost Science & Utilization* 7: 66-82.
- Caballero, A., J. J. Lazaro, J. L. Ramos, and A. Esteve-Nunez. 2005.** PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environmental Microbiology* 7: 1211-1219.
- Calabrese, E. J., and L. A. Baldwin. 2002.** Hormesis and high-risk groups. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 35: 414-428.
- Calamari, D., S. Galassi, F. Setti, and M. Vighi. 1983.** Toxicity of selected chlorobenzenes to aquatic organisms. *Chemosphere* 12: 253-262.

- Campbell, J. A., G. J. Davies, V. Bulone, and B. Henrissat. 1997.** A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 326: 929-939.
- Campos, V. M., I. Merino, R. Casado, L. F. Pacios, and L. Gomez. 2008.** Phytoremediation of organic pollutants. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 38-47.
- Carman, E. P., T. L. Crossman, and E. G. Gatliff. 1998.** Phytoremediation of No. 2 fuel oil-contaminated soil. *Journal of Soil Contamination* 7: 455-466.
- Casida, J. E. 1973.** Insecticide biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* 42: 259-278.
- CEIP, 2009** Centre on Emission Inventories and Projections. <http://www.ceip.at>
- Chambers, C. W., H. H. Tabak, and P. W. Kabler. 1963.** Degradation of aromatic compounds by phenol-adapted bacteria. *Journal Water Pollution Control Federation* 35: 1517-1528.
- Chambre régionale d'agriculture Rhône-Alpes. 2005.** www.rhone-alpes.cci.fr
- Charnets.Wa, Lichtens.Ep, and R. F. Evert. 1973.** Effects of lindane on cell structure of pea roots. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 51: 2111-&.
- Chaton, P. F., P. Ravanel, J. C. Meyran, and M. Tissut. 2001.** The toxicological effects and bioaccumulation of fipronil in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* in aqueous medium. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 69: 183-188.
- Chaudhry, Q., P. Schröder, D. Werck-Reichhart, W. Grajek, and R. Marecik. 2002.** Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 9: 4-17.
- Chaudhry, Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta, and E. J. Joner. 2005.** Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 12: 34-48.
- Chen, S. H., F. L. Xu, R. Dawson, X. C. Jiao, and S. Tao. 2007.** Adsorption and absorption of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and metabolites (DDD and DDE) by rice roots. *Environmental Pollution* 147: 256-261.
- Chen, Z., and D. R. Gallie. 2004.** The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16: 1143-1162.
- Cherifi, M., M. Raveton, A. Picciocchi, P. Ravanel, and M. Tissut. 2001.** Atrazine metabolism in corn seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 665-672.

- Chu, W., and K. H. Chan. 2000.** The prediction of partitioning coefficients for chemicals causing environmental concern. *Science of the Total Environment* 248: 1-10.
- Coleman, J. O. D., R. Randall, and M. M. A. BlakeKalff. 1997.** Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: A fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell and Environment* 20: 449-460.
- Collins, C., M. Fryer, and A. Grosso. 2006.** Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environmental Science & Technology* 40: 45-52.
- Colmer, T. D. 2003.** Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 91: 301-309.
- Corbett, J.R. 1974.** The Biochemical Mode of Action of Pesticides. New York: Academic Press, London p 92.
- Corgie, S. C., T. Beguiristain, and C. Leyval. 2004.** Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3552-3557.
- Cottin, N., and G. Merlin. 2010.** Fate of Chlorinated Benzenes in Laboratory Peat and Pozzolana Filters. *Water Air and Soil Pollution* 213: 425-435.
- Courdouan, A., Marcacci, S., Gupta, S., Schwitzguébel, J.P. 2004.** Lindane and Technical HCH Residues in Indian Soils and Sediments: A Critical Appraisal. n JSS - J Soils & Sediments, vol. 4, num. 3 2004. p. 192-196
- Coutinho, P. M., E. Deleury, G. J. Davies, and B. Henrissat. 2003.** An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology* 328: 307-317.
- Cummins, I., D. P. Dixon, S. Freitag-Pohl, M. Skipsey, and R. Edwards. 2011.** Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews* 43: 266-280.
- Curl, E.A., Truelove, B., 1986.** The Rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin.
- Curl, R. L. 1984.** Handbook of environmental data on organic-chemicals, 2nd edition - Verschueren, K. *Journal of the American Chemical Society* 106: 830-830.
- Darrah, P. R. 1993.** The rhizosphere and plant nutrition - a quantitative approach. *Plant and Soil* 155: 1-20.
- Dec, J., and J. M. Bollag. 1994.** Use of plant-material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 1132-1139.
- Deo, P. G., N. G. Karanth, and N. G. K. Karanth. 1994.** Biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in soil and food environment. *Critical Reviews in Microbiology* 20: 57-78.

- Dettenmaier, E. M., W. J. Doucette, and B. Bugbee. 2009.** Chemical Hydrophobicity and Uptake by Plant Roots. *Environmental Science & Technology* 43: 324-329.
- Diekmann, F., A. Nepovim, and P. Schroeder. 2004.** Influence of *Serratia liquefaciens* and a xenobiotic glutathione conjugate on the detoxification enzymes in a hairy root culture of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik* 78: 64-67.
- Dietz, A. C., and J. L. Schnoor. 2001.** Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives* 109: 163-168.
- Directive CEE 80-778 du 15 juillet 1980** - Directive 80/778/CEE du Conseil, du 15 juillet 1980, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine Journal officiel n° L 229 du 30/08/1980 p. 0011 - 0029
- Directive 91/414/CEE du 15 juillet 1991** - Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques Journal officiel n° L 230 du 19/08/1991 p. 0001 - 0032
- Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE) - Directive 2000/60/CE** du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau Journal officiel n° L 327 du 22/12/2000 p. 0001 - 0073
- DIREN Rhône-Alpes. 2003 et 2008.** Rapport d'activité : Etat des lieux sur les pesticides dans la région Rhône-Alpes www.rdbrmc-travaux.com
- Dixon, D. P., D. J. Cole, and R. Edwards. 1997.** Characterization and regulation of multiple glutathione transferases in corn (*Zea mays*). *Plant Physiology* 114: 746-746.
- Dixon, D. P., A. G. McEwen, A. J. Laphorn, and R. Edwards. 2003.** Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *Journal of Biological Chemistry* 278: 23930-23935.
- Dolinar, N., and A. Gaberscik. 2010.** Mycorrhizal colonization and growth of *Phragmites australis* in an intermittent wetland. *Aquatic Botany* 93: 93-98.
- Du, Q., Jia, X., Yuan, B. 2006.** Toxic effects of 1,2,4-trichlorobenzene on rice seed germination and seedling growth. *Ying Yong sheng tai Xue Bao*. 2006 Nov; 17(11):2185-8
- Duggan, R. E., H. C. Barry, and L. Y. Johnson. 1966.** Pesticide residues in total-diet samples. *Science* 151: 101.
- Edwards D., Pahlen G., Bertram C., Nathanail P. 2005.** Best Practice Guidance for Sustainable Brownfield Regeneration, Regeneration of European Sites and Cities and Urban Environments, Land Quality Press, Londres, 143 p

- Edwards, R., and W. J. Owen. 1986.** Comparison of glutathione s-transferases of *zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta* 169: 208-215.
- Edwards, R., D. P. Dixon, and V. Walbot. 2000.** Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193-198.
- Edwards, R., and D. P. Dixon. 2005.** Plant glutathione transferases. Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases. *Methods in Enzymology* 401: 169-186.
- El-Masri, H.A., Tessari, J.D., Yang, R.S.H., 1996.** Exploration of an interaction threshold for the joint toxicity of trichloroethylene and 1,1-dichloroethylene: utilization of a PBPK model. *Archives of Toxicology* 70, 527-539.
- European Environment Agency. 2003.** European Community greenhouse gas inventory 1990-2001 and inventory report 2003 (Final draft), Submission to the UNFCCC Secretariat, EEA Technical Report, n°95, 132p.
- EXTOXNET. 1996.** Pesticide Information Profile: Lindane, Available from: [Revised June 1996.]. <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/lindane.htm>.
- Fathepure, B. Z., J. P. Nengu, and S. A. Boyd. 1987.** Anaerobic-bacteria that dechlorinate perchloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2671-2674.
- Feidieker, D., P. Kampfer, and W. Dott. 1995.** Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic-compounds and hch in the subsurface environment. *Journal of Contaminant Hydrology* 19: 145-169.
- Felsot, A. S. 1996.** Potential of biostimulation to enhance dissipation of herbicide residues in landfarmed waste. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 212: 96-AGRO.
- Ferro, A.M., Rock, S.A., Kennedy, J., Herrick, J.J., Turner, D.L. 1999.** Phytoremediation of soils contaminated with wood preservatives: green house and field evaluations. *International Journal of Phytoremediation*, 1: 289-306.
- Field, J. A., and R. Sierra-Alvarez. 2008.** Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation* 19: 463-480.
- Fonnepfister, R., and K. Kreuz. 1990.** Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome p450-dependent enzyme from maize. *Phytochemistry* 29: 2793-2796.
- Foyer, C. H., F. L. Theodoulou, and S. Delrot. 2001.** The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* 6: 486-492.

- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2005.** Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- Friesen-Pankratz, B., C. Doebel, A. Farenhorst, and L. G. Goldsborough. 2003.** Interactions between algae (*Selenastrum capricornutum*) and pesticides: Implications for managing constructed wetlands for pesticide removal. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 38: 147-155.
- Fritz, H., Reineke, W., Schmidt, E. 1991.** Toxicity of chlorobenzene on *Pseudomonas* sp. strain RHO1, a chlorobenzene-degrading strain. *Biodegradation* 2:165-170
- Frova, C. 2003.** The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* 119: 469-479.
- Fujisawa, T., K. Ichise-Shibuya, and T. Katagi. 2010.** Uptake and transformation of phenols by duckweed (*Lemna gibba*). *Journal of Pesticide Science* 35: 456-463.
- Gallandt, E. R., and N. E. Balke. 1995.** Xenobiotic glucosyltransferase activity from suspension-cultured *glycine-max* cells. *Pesticide Science* 43: 31-40.
- Garrison, A. W. 1969.** Analytical studies of textile wastes. Abstracts of Papers of the American Chemical Society: WA27-&.
- Geoffroy, L., U. Frankart, and P. Eullaffroy. 2004.** Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution* 131: 233-241.
- Gerhardt, K. E., M. A. Lampi, and B. M. Greenberg. 2008.** The Effects of Far-red Light on Plant Growth and Flavonoid Accumulation in *Brassica napus* in the Presence of Ultraviolet B Radiation. *Photochemistry and Photobiology* 84: 1445-1454.
- Gibson, S. I. 2004.** Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* 55: 253-264.
- Gill, S. S., and N. Tuteja. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gomez-Hermosillo, C., J. H. Pardue, and D. D. Reible. 2006.** Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments. *Environmental Science & Technology* 40: 3229-3236.
- Green, C., and Hoffnagle, A. 2004.** Phytoremediation Field Studies Database for Chlorinated Solvents, Pesticides, Explosives, and Metals. <http://clu-in.org/download/studentpapers/hoffnagle-phytoremediation.pdf>
- Guang Y., 2007.** 1,2,4-Trichlorobenzene (an/aerobic) Pathway Map. © 2007, University of Minnesota

- Guerin, T. F. 1999.** Potential underestimation of mineralization in (14)carbon-organochlorine biodegradation studies. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30: 1667-1680.
- Guerin, T. F. 2008.** Ex-situ bioremediation of chlorobenzenes in soil. *Journal of Hazardous Materials* 154: 9-20.
- Haberl, R., Grego, S., Langergraber, G., Kadlec, R.H., Cicalini, A.-R., Martins Dias, S., Novais, J.M., Aubert, S., Gerth, A., Thomas, H., Hebner, A., 2003.** Constructed wetlands for the treatment of organic pollutants. *J. Soils Sediments* 3, 109–124.
- Haigler, B. E., G. R. Johnson, W. C. Suen, and J. C. Spain. 1999.** Biochemical and genetic evidence for meta-ring cleavage of 2,4,5-trihydroxytoluene in *Burkholderia* sp strain DNT. *Journal of Bacteriology* 181: 965-972.
- Hans, R. K., M. Farooq, G. S. Babu, S. P. Srivastava, P. C. Joshi, and P. N. Viswanathan. 1999.** Agricultural produce in the dry bed of the River Ganga in Kanpur, India - A new source of pesticide contamination in human diets. *Food and Chemical Toxicology* 37: 847-852.
- Hart J.J., 1993.** Paraquat resistance and modified transport and/or compartmentation. *Abstr. Meet. Weed Sci. Soc. Am.*, 33-36
- Hartmann, A., Rothballer, M., and Schmid, M. 2008** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312:7-14
- Hatton, P. J., D. Dixon, D. J. Cole, and R. Edwards. 1996.** Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. *Pesticide Science* 46: 267-275.
- Hatzios, K.K. 2000.** Herbicide safeners and synergists. In: Roberts T, ed. *Metabolism of agrochemicals in plants*. New York: John Wiley, 259-294.
- Hatzios, K. K., and N. Burgos. 2004.** Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Science* 52: 454-467.
- Hayes, J. D., and L. I. McLellan. 1999.** Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a Co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research* 31: 273-300.
- He, Y. W., T. H. Sun, Z. Q. Ou, A. Yediler, and A. Kettrup. 1996.** Fate of 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB) in soil-rice paddy system. *Chemosphere* 32: 1381-1389.
- Henzler, T., and E. Steudle. 2000.** Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of Experimental Botany* 51: 2053-2066.

- Hiltner L. 1904.** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98:59–78
- Hinsinger, P. 1998.** Structure and function of the rhizosphere: mechanisms at the soil-root interface. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 5: 340-341.
- Hinsinger, P. 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237: 173-195.
- Hinsinger, P., A. G. Bengough, D. Vetterlein, and I. M. Young. 2009.** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321: 117-152.
- Hiraga, S., K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi, and H. Matsui. 2001.** A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42: 462-468.
- Holliger, C., G. Schraa, A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder. 1992.** Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1636-1644.
- Holt, D. C., V. J. Lay, E. D. Clarke, A. Dinsmore, I. Jepson, S. W. J. Bright, and A. J. Greenland. 1995.** CHARACTERIZATION OF THE SAFENER-INDUCED GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ISOFORM-II FROM MAIZE. *Planta* 196: 295-302.
- Howard P.H. 1989.** Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Boca, Raton, Boston, London, New-York, Washington, Lewis, vol 1
- HSDB. 2000.** 1,2,4-trichlorobenzene. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
- HSDB. 2000.** 1,4-dichlorobenzene. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
- HSDB. 2000.** Chlorobenzene. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
- Huang, H. L., S. Z. Zhang, B. D. Chen, N. Y. Wu, X. Q. Shan, and P. Christy. 2006.** Uptake of atrazine and cadmium from soil by maize (*Zea mays* L.) in association with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9377-9382.
- Hyman M et Dupont R.R. 2001.** Groundwater and Soil Remediation, Process Design and Cost Estimating of Proven technologies, ASCE Press, Reston, Virginie, 534 p.
- Ilyina, T., T. Pohlmann, G. Lammel, and J. Sundennann. 2006.** A fate and transport ocean model for persistent organic pollutants and its application to the North Sea. *Journal of Marine Systems* 63: 1-19.

- Imfeld, G., M. Braeckevelt, P. Kusch, and H. H. Richnow. 2009.** Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74: 349-362.
- Imlay, J. A. 2008.** Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, pp. 755-776, *Annual Review of Biochemistry*.
- INERIS. 2005. INERIS-DRC-01-25590-01DF007.doc.,** Version N°2-3-février 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, le monochlorobenzène.
- INERIS. 2006. INERIS-DRC-01-25590-01DR019.doc.,** Version N°2.1-juin 2006. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, le 1,4-dichlorobenzène.
- INRA. 2009.** <http://taste.versailles.inra.fr/inapg/phytoremed/eco/index.htm> [28 juillet 2009].
- INRS. 2009.** <http://www.inrs.fr>
- IUCLID. 1996.** Chlorobenzene. International Uniform Chemical Information Database, European Commission ISPRA. CD-ROOM.
- Jablonkai, I., and K. K. Hatzios. 1991.** Role of glutathione and glutathione-s-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 41: 221-231.
- Jablonkai, I., and K. K. Hatzios. 1993.** In-vitro conjugation of chloroacetanilide herbicides and atrazine with thiols and contribution of nonenzymatic conjugation to their glutathione-mediated metabolism in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1736-1742.
- Jagnow, G., K. Haider, and P. C. Ellwardt. 1977.** Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology* 115: 285-292.
- Jansen, M. A. K., L. M. Hill, and R. N. F. Thorneley. 2004.** A novel stress-acclimation response in *Spirodela punctata* (Lemnaceae): 2,4,6-trichlorophenol triggers an increase in the level of an extracellular peroxidase, capable of the oxidative dechlorination of this xenobiotic pollutant. *Plant Cell and Environment* 27: 603-613.
- Jarausch-Wehrheim, B., B. Mocquot, and M. Mench. 1999.** Absorption and translocation of sludge-borne zinc in field-grown maize (*Zea mays* L.). *European Journal of Agronomy* 11: 23-33.
- Jepson, I., V. J. Lay, D. C. Holt, S. W. J. Bright, and A. J. Greenland. 1994.** Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione-s-transferase isoform-i, isoform-ii and isoform-iv. *Plant Molecular Biology* 26: 1855-1866.

- Jha, P. N., and A. Kumar. 2007.** Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1311-1320.
- Jiangbi, L. 2006.** 1,4-dichlorobenzene pathway map: University of Minnesota Biocatalysis/biodegradation database, online at http://umbbd.msi.umn.edu/dcz/dcz_map.html, accessed October 25, 2006.
- Jones, P., and T. Vogt. 2001.** Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174.
- Joo, J. C., C. D. Shackelford, and K. F. Reardon. 2008.** Sorption of nonpolar neutral organic compounds to humic acid-coated sands: Contributions of organic and mineral components. *Chemosphere* 70: 1290-1297.
- Joseph, R., S. Reed, K. Jayachandran, C. Clark-Cuadrado, and C. Dunn. 2010.** Endosulfan has no adverse effect on soil respiration. *Agriculture Ecosystems & Environment* 138: 181-188.
- Jouanneau, Y., J. C. Willison, C. Meyer, S. Krivobok, N. Chevron, J. L. Besombes, and G. Blake. 2005.** Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environmental Science & Technology* 39: 5729-5735.
- Journal Officiel. 1997.** interdiction de la mise sur le marché pour usages agricoles des préparations à base de lindane depuis le 31 mars 1998 et interdiction d'emploi depuis 1er juillet 1998. J.O. du 15 février 1997.
- Jury, W. A., Spencer, W. F., Farmer W. J. 1983.** Behavior assesment model for trace organics in soil. I. Model description. *J. Environ. Qual.*, 12, 558-564.
- Kaplan, O., V. Vejvoda, O. Plihal, P. Pompach, D. Kavan, P. Bojarova, K. Bezouska, M. Mackova, M. Cantarella, V. Jirku, V. Kren, and L. Martinkova. 2006.** Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 567-575.
- Keefe, S. H., L. B. Barber, R. L. Runkel, and J. N. Ryan. 2004.** Fate of volatile organic compounds in constructed wastewater treatment wetlands. *Environmental Science & Technology* 38: 2209-2216.
- Khan, N. A., S. Singh, N. A. Anjum, and R. Nazar. 2008.** Cadmium effects on carbonic anhydrase, photosynthesis, dry mass and antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) under low and sufficient zinc. *Journal of Plant Interactions* 3: 31-37.
- Kidd, P. S., M. J. Dominguez-Rodriguez, J. Diez, and C. Monterroso. 2007.** Bioavailability and plant accumulation of heavy metals and phosphorus in agricultural soils amended by long-term application of sewage sludge. *Chemosphere* 66: 1458-1467.

- Kidd, P. S., A. Prieto-Fernandez, C. Monterroso, and M. J. Acea. 2008.** Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil* 302: 233-247.
- Kirk-Othmer.1983.** Chlorobenzene, *Encyclopedia of Chemical Technology*. New-York, John Wiley and Sons. 3rd Ed.
- Klein, M., B. Burla, and E. Martinoia. 2006.** The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *Febs Letters* 580: 1112-1122.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu, and S. A. Zhang. 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
- Knowles, P., G. Dotro, J. Nivala, and J. Garcia. 2011.** Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors. *Ecological Engineering* 37: 99-112.
- Koch, A. K., O. Kappeli, A. Fiechter, and J. Reiser. 1991.** Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *pseudomonas-aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology* 173: 4212-4219.
- Kohli, J., I. Weisgerber, W. Klein, and F. Korte. 1976.** Contributions to ecological chemistry .107. fate of lindane-c-14 in lettuce, endives and soil under outdoor conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 11: 23-32.
- Komives, T., and G. Gullner. 2005.** Phase I xenobiotic metabolic systems in plants. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 60: 179-185.
- Komossa, D., and H. Sandermann. 1995.** Plant metabolic studies of the growth-regulator maleic hydrazide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2713-2715.
- Kong, F. X., W. Hu, and Y. Liu. 1998.** Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environmental and Experimental Botany* 40: 105-111.
- Kotchoni, S. O., and E. W. Gachomo. 2006.** The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of Biosciences* 31: 389-404.
- Kraaij, H., and D. W. Connell. 1997.** Bioconcentration and uptake kinetics of chlorobenzenes in soy-bean roots. *Chemosphere* 34: 2607-2620.
- Kruger, E. L., J. C. Anhalt, D. Sorenson, B. Nelson, A. L. Chouhy, T. A. Anderson, and J. R. Coats. 1997.** Atrazine degradation in pesticide-contaminated soils: Phytoremediation potential, pp. 54-64. *In* E. L. Kruger, T. A. Anderson and J. R. Coats [eds.], *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*.

- Kuiper, I., E. L. Lagendijk, R. Pickford, J. P. Derrick, G. E. M. Lamers, J. E. Thomas-Oates, B. J. J. Lugtenberg, and G. V. Bloemberg. 2004.** Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular Microbiology* 51: 97-113.
- Kumar, J. L. G., and Y. Q. Zhao. 2011.** A review on numerous modeling approaches for effective, economical and ecological treatment wetlands. *Journal of Environmental Management* 92: 400-406.
- L'Huillier, L., 1997.** Mécanismes d'action toxique du nickel chez le maïs. Documents scientifiques et techniques III volume spécial. *Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*. ISSN 1245-222X-Juin 1997 p 215-222
- Lairson, L. L., B. Henrissat, G. J. Davies, and S. G. Withers. 2008.** Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms, pp. 521-555, *Annual Review of Biochemistry*.
- Lal, R., G. Pandey, P. Sharma, K. Kumari, S. Malhotra, R. Pandey, V. Raina, H. P. E. Kohler, C. Holliger, C. Jackson, and J. G. Oakeshott. 2010.** Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 58-+.
- Landberg, T., and M. Greger. 2002.** Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *Journal of Plant Physiology* 159: 69-75.
- Lee, C. L., H. J. Song, and M. D. Fang. 2000.** Concentrations of chlorobenzenes, hexachlorobutadiene and heavy metals in surficial sediments of Kaohsiung coast, Taiwan. *Chemosphere* 41: 889-899.
- Lee, S. J., J. H. Pardue, W. M. Moe, and K. T. Valsaraj. 2003.** Mineralization of desorption-resistant 1,4-dichlorobenzene in wetland soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2312-2322.
- Lee, S., J. H. Pardue, W. M. Moe, and D. J. Kim. 2009.** Effect of sorption and desorption-resistance on biodegradation of chlorobenzene in two wetland soils. *Journal of Hazardous Materials* 161: 492-498.
- Leigh, M. B., J. S. Fletcher, X. O. Fu, and F. J. Schmitz. 2002.** Root turnover: An important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environmental Science & Technology* 36: 1579-1583.
- Leigh, M. B., P. Prouzova, M. Mackova, T. Macek, D. P. Nagle, and J. S. Fletcher. 2006.** Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2331-2342.
- Leppich, J., J. H. Pardue, and W. A. Jackson. 2000.** Plant-air partitioning of chlorobenzenes in wetland vegetation at a Superfund site.

- Li, L. N., L. V. Modolo, L. L. Escamilla-Trevino, L. Achnine, R. A. Dixon, and X. Q. Wang. 2007.** Crystal structure of Medicago truncatula UGT85H2 - Insights into the structural basis of a multifunctional (Iso)flavonoid glycosyltransferase. *Journal of Molecular Biology* 370: 951-963.
- Li, Y. F. 1999.** Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Science of the Total Environment* 232: 121-158.
- Lichtenstein, E. P., G. T. Cowley, and W. F. Millington. 1962.** Insecticide effects on plant growth - effect of various insecticides on growth and respiration of plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10: 251-&.
- Lim, E. K., and D. J. Bowles. 2004.** A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *Embo Journal* 23: 2915-2922.
- Lin, Q. X., and I. A. Mendelssohn. 2009.** Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecological Engineering* 35: 85-91.
- Listes I et II de la (DCE 76-464/CEE) Directive 76/464/CEE** DIREN Rhône-Alpes, 2009 - du Conseil, du 4 mai 1976, concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté *Journal officiel* n° L 129 du 18/05/1976 p. 0023 - 0029
- Liu, H., D. Weisman, Y. B. Ye, B. Cui, Y. H. Huang, A. Colon-Carmona, and Z. H. Wang. 2009.** An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 176: 375-382.
- Liu, L., C. Y. Jiang, X. Y. Liu, J. F. Wu, J. G. Han, and S. J. Liu. 2007.** Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp strain CNB-1. *Environmental Microbiology* 9: 465-473.
- Liu, W., Q. X. Zhou, P. J. Li, T. H. Sun and Y. S. Yang. 2003.** Toxic effects of 1,2,4-trichlorobenzene stress on chromosomal aberration and cell division of root-tip cells in broadbean (*Vicia faba*) seedlings. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 689-697.
- Liu, W., Q. X. Zhou, P. J. Li, T. H. Sun, Y. S. Yang, and X. Z. Xiong. 2003.** 1,2,4-trichlorobenzene induction of chromosomal aberrations and cell division of root-tip cells in *Vicia faba* seedlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 689-697.
- Liu, W., Y. S. Yang, P. Li, Q. Zhou, and T. Sun. 2004.** Root growth inhibition and induction of DNA damage in soybean (*Glycine max*) by chlorobenzenes in contaminated soil. *Chemosphere* 57: 101-106.
- Lomonte, C., C. Sgherri, A. J. M. Baker, S. D. Kolev, and F. Navari-Izzo. 2010.** Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to mercury. *Environmental and Experimental Botany* 69: 9-16.

- Lorenz H., 2004.** Rhizosphere 2004 perspectives and challenges ; a tribute to Lorenz Hiltner ; international congress, 12 – 17 Sept. 2004 Vol 20 de GSF-Bericht, Oberschleissheim GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit Neuherberg Institut für Bodenökologie (Neuherberg, Oberschleissheim). National Research Center for Environment and Health, 2005 333p.
- Loureiro, I., E. Rodriguez-Garcia, C. Escorial, J. M. Garcia-Baudin, J. L. Gonzalez-Andujar, and M. C. Chueca. 2010.** Distribution and frequency of resistance to four herbicide modes of action in *Lolium rigidum* Gaud. accessions randomly collected in winter cereal fields in Spain. *Crop Protection* 29: 1248-1256.
- Loutre, C., D. P. Dixon, M. Brazier, M. Slater, D. J. Cole, and R. Edwards. 2003.** Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *Plant Journal* 34: 485-493.
- Lyman W.J., Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. 1982.** Handbook of Chemical Property Estimation Methods - Environmental Behaviour of Organic Compounds. New York, Mc Graw- Hill Book Co
- Ma, X. M., and J. G. Burken. 2002.** VOCs fate and partitioning in vegetation: Use of tree cores in groundwater analysis. *Environmental Science & Technology* 36: 4663-4668.
- Ma, X. M., and J. G. Burken. 2003.** VOCs fate and partitioning in vegetation: Potential use of tree cores in groundwater analysis (vol 36, p 4663, 2002). *Environmental Science & Technology* 37: 2024-2024.
- Ma, X. M., and M. M. Havelka. 2009.** Phytotoxicity of Chlorinated Benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environmental Toxicology* 24: 43-48.
- MacLeod, C.J.A., 1999.** The fate of chlorinated organic pollutants in a reed-bed system. In: Leeson, A., Alleman, B.C. (Eds.), *Phytoremediation and Innovative Strategies for Specialized Remedial Applications: The Fifth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. San Diego(CA), April 19–22, 1999. Batelle Press, Columbus(OH), USA, pp. 109–114
- Magee, K. D., A. Michael, H. Ullah, and S. K. Dutta. 2008.** Dechlorination of PCB in the presence of plant nitrate reductase. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25: 144-147.
- Malaney, G.W., McKinney, R.E. 1966.** Oxidative abilities of benzene-acclimated activated sludge. *Water Sewage Works* 113:302-309.
- Malcolm H.M., Howe, P.D. Dobson S. 2004.** Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene : environmental aspects. International Programme on Chemical Safety, Genève, Suisse Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, Geneva, international.

- Marcacci, S., M. Raveton, P. Ravanel, and J. P. Schwitzguebel. 2005.** The possible role of hydroxylation in the detoxification of atrazine in mature vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 60: 427-434.
- Marco-Urrea, E., M. Perez-Trujillo, G. Caminal, and T. Vicent. 2009.** Dechlorination of 1,2,3-and 1,2,4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials* 166: 1141-1147.
- Marrs, K. A., M. R. Alfenito, A. M. Lloyd, and V. Walbot. 1995.** A glutathione-S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *bronze-2*. *Nature* 375: 397-400.
- Marrs, K. A., and V. Walbot. 1997.** Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiology* 113: 93-102.
- Mars, A. E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M. H. vanAgteren, D. B. Janssen, and W. Reineke. 1997.** Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *Journal of Bacteriology* 179: 4530-4537.
- Marvin, C., S. Painter, D. Williams, V. Richardson, R. Rossmann, and P. Van Hoof. 2004.** Spatial and temporal trends in surface water and sediment contamination in the Laurentian Great Lakes. *Environmental Pollution* 129: 131-144.
- Mazzola, M. 1999.** Transformation of soil microbial community structure and *Rhizoctonia*-suppressive potential in response to apple roots. *Phytopathology* 89: 920-927.
- Mazzola, M., and Y. H. Gu. 2000.** Phyto-management of microbial community structure to enhance growth of apple in replant soils, pp. 73-78. *In* M. L. Gullino, A. Garibaldi, J. Katan and A. Matta [eds.], *Proceedings of the International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation*.
- McGonigle, B., S. J. Keeler, S. M. C. Lan, M. K. Koeppe, and D. P. O'Keefe. 2000.** A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology* 124: 1105-1120.
- McLean, K. J., M. Sabri, K. R. Marshall, R. J. Lawson, D. G. Lewis, D. Clift, P. R. Balding, A. J. Dunford, A. J. Warman, J. P. McVey, A. M. Quinn, M. J. Sutcliffe, N. S. Scrutton, and A. W. Munro. 2005.** Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochemical Society Transactions* 33: 796-801.
- Megharaj, M., B. Ramakrishnan, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, and R. Naidu. 2011.** Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International* 37: 1362-1375.
- Meharg, A. A., J. Wright, and D. Osborn. 2000.** Chlorobenzenes in rivers draining industrial catchments. *Science of the Total Environment* 251: 243-253.

- Memon, A.R. and Schröder, P., 2009.** Implications Of Metal Accumulation Mechanisms To Phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res.* 16 : 162–175.
- Mench, M., J. L. Morel, A. Guckert, and B. Guillet. 1988.** Metal-binding with root exudates of low-molecular weight. *Journal of Soil Science* 39: 521-527.
- Mench, M., J. Tancogne, A. Gomez, and C. Juste. 1989.** Cadmium bioavailability to *Nicotiana-tabacum*-L, *Nicotiana-rustica* L, and *Zea-mays*-L grown in soil amended or not amended with cadmium nitrate. *Biology and Fertility of Soils* 8: 48-53.
- Mench, M., C. Juste, and P. Solda. 1992.** Metal accumulation in crops resulting from long-term application of sewage-sludge in soil. *Bulletin De La Societe Botanique De France-Actualites Botaniques* 139: 141-156.
- Mench, M., J. P. Schwitzguebel, P. Schroeder, V. Bert, S. Gawronski, and S. Gupta. 2009.** Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 876-900.
- Menone, M. L., S. F. Pesce, M. P. Diaz, V. J. Moreno, and D. A. Wunderlin. 2008.** Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry* 69: 1150-1157.
- Messner, B., O. Thulke, and A. R. Schaffner. 2003.** Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* 217: 138-146.
- Metcalf, R. L. 1955.** Physiological basis for insect resistance to insecticides. *Physiological Reviews* 35: 197-232.
- Michalowicz, J., and W. Duda. 2009.** The Effects of 2,4,5-Trichlorophenol on Some Antioxidative Parameters and the Activity of Glutathione S-Transferase in Reed Canary Grass Leaves (*Phalaris arudinacea*). *Polish Journal of Environmental Studies* 18: 845-852.
- Miglioranza, K. S. B., J. E. A. De Moreno, and V. J. Moreno. 2003.** Dynamics of organochlorine pesticides in soils from a southeastern region of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 712-717.
- Miglioranza, K. S. B., J. E. A. de Moreno, and V. J. Moreno. 2004.** Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water Research* 38: 1765-1772.
- Mikes, O., P. Cupr, S. Trapp, and J. Klanova. 2009.** Uptake of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides from soil and air into radishes (*Raphanus sativus*). *Environmental Pollution* 157: 488-496.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.

- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Van Breusegem. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Modolo, L. V., L. N. Li, H. Y. Pan, J. W. Blount, R. A. Dixon, and X. Q. Wang. 2009.** Crystal Structures of Glycosyltransferase UGT78G1 Reveal the Molecular Basis for Glycosylation and Deglycosylation of (Iso)flavonoids. *Journal of Molecular Biology* 392: 1292-1302.
- Monferran, M. V., D. A. Wunderlin, J. Nimptsch, and S. Pflugmacher. 2007.** Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68: 2073-2079.
- Monferran, M. V., S. F. Pesce, J. Cazenave, and D. A. Wunderlin. 2008.** Detoxification and antioxidant responses in diverse organs of *Jenynsia multidentata* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Environmental Toxicology* 23: 184-192.
- Moons, A. 2005.** Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs), pp. 155-202. *In* G. Litwack [ed.], *Plant Hormones*.
- Mostafa, F. I. Y., and C. S. Helling. 2002.** Impact of four pesticides on the growth and metabolic activities of two photosynthetic algae. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 37: 417-444.
- Mothes, F., N. Reiche, P. Fiedler, M. Moder, and H. Borsdorf. 2010.** Organic Compounds in Plants: the Matrix Problem. *Nachrichten Aus Der Chemie* 58: 1264-1267.
- Moya, J. L., R. Ros, and I. Picazo. 1993.** Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynthesis Research* 36: 75-80.
- Mrozik, A., Z. Piotrowska-Seget, and S. Labuzek. 2003.** Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* 12: 15-25.
- Murakami, M., N. Ae, and S. Ishikawa. 2007.** Phytoextraction of cadmium by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *Environmental Pollution* 145: 96-103.
- Nagata, Y., A. Futamura, K. Miyauchi, and M. Takagi. 1999.** Two different types of dehalogenases, LinA and LinB, involved in gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *Journal of Bacteriology* 181: 5409-5413.
- Nash, R. G., and E. A. Woolson. 1967.** Persistence of chlorinated hydrocarbon insecticides in soils. *Science* 157: 924-&.

- Nathanail, J. Bardos, P. and Nathanail, P. 2002.** Contaminated Land Management: Ready Reference. EPP Publications/Land Quality Press. Available from: EPP Publications, 52 Kings Road, Richmond TW10 6EP, UK
- Newman, L. A., and C. M. Reynolds. 2004.** Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 225-230.
- Nietch, C. T., J. T. Morris, and D. A. Vroblesky. 1999.** Biophysical mechanisms of trichloroethane uptake and loss in baldcypress growing in shallow contaminated groundwater. *Environmental Science & Technology* 33: 2899-2904.
- Nishino, S. F., J. C. Spain, L. A. Belcher, and C. D. Litchfield. 1992.** Chlorobenzene degradation by bacteria isolated from contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1719-1726.
- Niviere, V., and M. Fontecave. 2004.** Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9: 119-123.
- Novotny, C., B. R. M. Vyas, P. Erbanova, A. Kubatova, and V. Sasek. 1997.** Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. *Folia Microbiologica* 42: 136-140.
- Offen, W., C. Martinez-Fleites, M. Yang, E. Kiat-Lim, B. G. Davis, C. A. Tarling, C. M. Ford, D. J. Bowles, and G. J. Davies. 2006.** Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *Embo Journal* 25: 1396-1405.
- Oldfield, C., N. T. Wood, S. C. Gilbert, F. D. Murray, and F. R. Faure. 1998.** Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 74: 119-132.
- Oltmanns, R. H., H. G. Rast, and W. Reineke. 1988.** Degradation of 1,4-dichlorobenzene by enriched and constructed bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28: 609-616.
- OMS IPCS. 1991.** Environmental Health Criteria 128: Monography of chlorobenzenes other than hexachlorobenzene, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- OMS IPCS. 1991.** Environmental Health Criteria 124: lindane. World Health Organisation, International Programme on chemical Safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- Osmani, S. A., S. Bak, and B. L. Moller. 2009.** Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70: 325-347.

- Overcash, M.R. (ed.). 1981.** Decomposition of Toxic and Nontoxic Organic Compounds in Soil. Ann Arbor Science/The Butterworth Group, Wobum, MA, 375 pp.
- Paradiso, A., R. Berardino, M. C. de Pinto, L. S. di Toppi, M. M. Storelli, F. Tommasi, and L. De Gara. 2008.** Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and Cell Physiology* 49: 362-374.
- Pardue, J. H., P. H. Masscheleyn, R. D. Delaune, W. H. Patrick, and D. D. Adrian. 1993.** Assimilation of hydrophobic chlorinated organics in fresh-water wetlands - sorption and sediment water exchange. *Environmental Science & Technology* 27: 875-882.
- Pardue, J. H. 2002.** Remediating chlorinated solvents in wetlands: Natural processes or an active approach?
- Park, J., H. T. Choi, S. Lee, T. Lee, Z. B. Yang, and Y. Lee. 2000.** Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiology* 124: 725-732.
- Passardi, F., D. Longet, C. Penel, and C. Dunand. 2004.** The class III peroxidase multigenic in land plants family in rice and its evolution. *Phytochemistry* 65: 1879-1893.
- Paterson, S., D. Mackay, D. Tam, and W. Y. Shiu. 1990.** Uptake of organic-chemicals by plants - a review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 21: 297-331.
- Pennathur, S., D. Maitra, J. Byun, I. Sliskovic, I. Abdulhamid, G. M. Saed, M. P. Diamond, and H. M. Abu-Soud. 2010.** Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 205-213.
- Pereira, R. C., M. Camps-Arbestain, B. R. Garrido, F. Macias, and C. Monterroso. 2006.** Behaviour of alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution* 144: 210-217.
- Pereira, R. C., C. Monterroso, and F. Macias. 2010.** Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* 79: 326-333.
- Petroutsos, D., P. Katapodis, P. Christakopoulos, and D. Kekos. 2007a.** Removal of p-chlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Journal of Applied Phycology* 19: 485-490.
- Petroutsos, D., J. Wang, P. Katapodis, D. Kekos, M. Sommerfeld, and Q. Hu. 2007b.** Toxicity and metabolism of p-chlorophenol in the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Aquatic Toxicology* 85: 192-201.

- Petroutsos, D., P. Katapodis, M. Samiotaki, G. Panavotou, and D. Kekos. 2008.** Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69: 707-714.
- Pflugmacher, S., and H. Sandermann. 1998.** Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiology* 117: 123-128.
- Pflugmacher, S., K. Geissler, and C. Steinberg. 1999.** Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in different cormus parts of *Phragmites australis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42: 62-66.
- Phillips J., 1990.** Target size and site-based herbicide resistance. *Proc. Australian Weeds Conference, 9 Meet.*, 247-248.
- Phillips, T. M., H. Lee, J. T. Trevors, and A. G. Seech. 2004.** Mineralization of hexachlorocyclohexane in soil during solid-phase bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 31: 216-222.
- Phillips, T. M., A. G. Seech, H. Lee, and J. T. Trevors. 2005.** Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16: 363-392.
- Pierre, J. L., and M. Fontecave. 1999.** Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals* 12: 195-199.
- Pilon-Smits, E. 2005.** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Pojer, K. 2008.** Substances dangereuses dans les eaux usées urbaines, Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, : 2e conférence Eau et Santé, 9 octobre 2008 GRAIE - Grand Lyon - ASTEE
- Pollmann, K., S. Beil, and D. H. Pieper. 2001.** Transformation of chlorinated benzenes and toluenes by *Ralstonia* sp strain PS12 *tecA* (tetrachlorobenzene dioxygenase) and *tecB* (chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase) gene products. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4057-4063.
- Pompella, A., A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, and A. F. Casini. 2003.** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 66: 1499-1503.
- Pongrac, P., K. Vogel-Mikus, P. Vavpetic, J. Tratnik, M. Regvar, J. Simcic, N. Grlj, and P. Pelicon. 2010.** Cd induced redistribution of elements within leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 268: 2205-2210.
- Popp, P., L. Bruggemann, P. Keil, U. Thuss, and H. Weiss. 2000.** Chlorobenzenes and hexachlorocyclohexanes (HCHs) in the atmosphere of Bitterfeld and Leipzig (Germany). *Chemosphere* 41: 849-855.
- Prager J.C.1995.** Chlorobenzene. *Environmental Contaminant Reference Databook*, Van Nostrand Reinhold, vol 1, p 245

- Qian, H. F., W. Chen, J. J. Li, J. Wang, Z. Zhou, W. P. Liu, and Z. W. Fu. 2009.** The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology* 92: 250-257.
- Quintero, J. C., M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema. 2005.** Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere* 61: 528-536.
- Rainey, F. A., K. Ray, M. Ferreira, B. Z. Gatz, M. F. Nobre, D. Bagaley, B. A. Rash, M. J. Park, A. M. Earl, N. C. Shank, A. M. Small, M. C. Henk, J. R. Battista, P. Kampfer, and M. S. da Costa. 2005.** Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5225-5235.
- Rapp, P., and L. H. E. Gabriel-Jurgens. 2003.** Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology-Sgm* 149: 2879-2890.
- Rausser, W. E. 1978.** Early effects of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel, and zinc in white beans. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 56: 1744-1749.
- Ravanel, P., M. H. Liegeois, D. Chevallier, and M. Tissut. 1999.** Soil thin-layer chromatography and pesticide mobility through soil microstructures - New technical approach. *Journal of Chromatography A* 864: 145-154.
- Raveton M., Ravanel P., and Tissut M. 1996.** Organisation in vivo des diverses voies de métabolisation de l'atrazine chez le maïs. Actes du XXVIème congrès du Groupe Français des Pesticides : Processus de transfert des produits phytosanitaires et modélisation dans les bassins versants, Nancy 22-23 mai 1996, 87-97.
- Raveton, M., P. Ravanel, M. Kaouadji, J. Bastide, and M. Tissut. 1997.** The chemical transformation of atrazine in corn seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58: 199-208.
- Raveton, M., A. Schneider, C. Desprez-Durand, P. Ravanel, and M. Tissut. 1999.** Comparative diffusion of atrazine inside aqueous or organic matrices and inside plant seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 65: 36-43.
- Reade, J. P. H., L. J. Milner, and A. H. Cobb. 2004.** A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. *Weed Science* 52: 468-474.
- Regnault-Roger, C., M. Ribodeau, A. Hamraoui, I. Bareau, P. Blanchard, M. I. Gil-Munoz, and F. T. Barberan. 2004.** Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research* 40: 395-408.

- Reineke, W., and H. J. Knackmuss. 1984.** Microbial-metabolism of haloaromatics - isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 395-402.
- Révision des zones prioritaires pesticides sur la Région Rhône-Alpes. 2008.** Révision des zones prioritaires pesticides sur la région Rhône-Alpes Etape de délimitation des zones sensibles Mars 2008. www.rhone-alpes.ecologie.gouv.fr
- Ricking, M., and J. Schwarzbauer. 2008.** HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin, Germany. *Environmental Chemistry Letters* 6: 83-89.
- Rios, D. A., A. E. T. Velez, M. R. Pena, and C. A. M. Parra. 2009.** Changes of flow patterns in a horizontal subsurface flow constructed wetland treating domestic wastewater in tropical regions. *Ecological Engineering* 35: 274-280.
- Roberts, T. 1998.** Metabolic pathways of agrochemicals. The Royal Society of Chemistry ed, Cambridge. *Pesticide Science* Vol 5, Issue 7 p756.
- Rocheleau, S., B. Lachance, R. G. Kuperman, J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman, and G. I. Sunahara. 2008.** Toxicity and uptake of cyclic nitarnine explosives in ryegrass *Lolium perenne*. *Environmental Pollution* 156: 199-206.
- Rodriguez-Garrido, B., M. C. Arbestain, M. C. Monterroso, and F. Macias. 2004.** Reductive dechlorination of alpha-, beta-, delta-, and gamma-hexachlorocyclohexane isomers by hydrocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environmental Science & Technology* 38: 5046-5052.
- Ross, J., Y. Li, E. K. Lim, and D. J. Bowles. 2001.** Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology* 2.
- Rossini, L., I. Jepson, A. J. Greenland, and M. S. Gorla. 1996.** Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant Physiology* 112: 1595-1600.
- Roy, S., and O. Hanninen. 1994.** Pentachlorophenol - uptake elimination kinetics and metabolism in an aquatic plant, *eichhornia-crassipes*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 763-773.
- Ryan, P. J., D. Gross, W. J. Owen, and T. L. Laanio. 1981.** The metabolism of chlortoluron, diuron, and CGA43057 in tolerant and susceptible plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 16: 213-221.
- Sagar, V., and D. P. Singh. 2011.** Biodegradation of lindane pesticide by non white- rots soil fungus *Fusarium* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27: 1747-1754.
- Salazar, A. G., and G. M. Paulsen. 1971.** Some physiological responses of sorghum-bicolor to benzene hexachloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19: 1005.

- Samarakoon, A. B., and W. E. Rauser. 1979.** Carbohydrate-levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus-vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel, and zinc. *Plant Physiology* 63: 1165-1169.
- San Miguel, A. 2007.** Diplôme Universitaire - Université de Grenoble 1. "Décontamination par phytoremédiation de sites pollués par le lindane, le 1,2,4-trichlorobenzène et le 1,2-dichlorobenzène : études préliminaires". Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553.
- Sandermann, H. 1992.** Plant-metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 82-84.
- Sandermann, H. 1994.** Higher-plant metabolism of xenobiotics - the green liver concept. *Pharmacogenetics* 4: 225-241.
- Saruhan, N., R. Terzi, A. Saglam, and A. Kadioglu. 2009.** The Relationship between Leaf Rolling and Ascorbate-Glutathione Cycle Enzymes in Apoplastic and Symplastic Areas of *Ctenanthe setosa* Subjected to Drought Stress. *Biological Research* 42: 315-326.
- Satchivi, N. M., E. W. Stoller, L. M. Wax, and D. P. Briskin. 2006.** A nonlinear, dynamic, simulation model for transport, and whole plant allocation of systemic xenobiotics following foliar application. IV: Physicochemical properties requirements for optimum absorption and translocation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84: 83-97.
- Scarponi, L., M. N. Alla, and L. Martinetti. 1992.** Metolachlor in corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) - persistence and biochemical signs of stress during its detoxification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 884-889.
- Schmidt, B., C. Rivero, and B. Thiede. 1995.** 3,4-dichloroaniline n-glucosyltransferase and n-malonyltransferase activities in cell-cultures and plants of soybean and wheat. *Phytochemistry* 39: 81-84.
- Schnoor, J. L., L. A. Licht, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe, and L. H. Carreira. 1995.** Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology* 29: A318-A323.
- Scholes, M.E., 1953.** The effect of hexachlorocyclohexane in roots of onion (*Allium cepa*) and strawberry (*Fragaria vesca*). *J. Horticultural Science*. 28: 49-67
- Schraa, G., M. L. Boone, M. S. M. Jetten, A. R. W. Vanneerven, P. J. Colberg, and A. J. B. Zehnder. 1986.** Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp strain-a175. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 1374-1381.
- Schröder, P., and C. E. Scheer. 2003.** Two different vacuolar enzymes are responsible for degradation of glutathione-S-conjugates in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BCPC International Congress Crop Science & Technology 2003*, vol 1 and 2, congress proceedings pp: 857-862

- Schröder, P., H. Maier, and R. Debus. 2005.** Detoxification of herbicides in *Phragmites australis*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 60: 317-324.
- Schröder, P., C. E. Scheer, F. Diekmann, and A. Stampfl. 2007.** How plants cope with foreign compounds - Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research* 14: 114-122.
- Schuler, L. J., A. J. Trimble, J. B. Belden, and M. J. Lydy. 2005.** Joint toxicity of triazine herbicides and organophosphate insecticides to the midge *Chironomus tentans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49: 173-177.
- Schwab, A. P., and M. K. Banks. 1994.** Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root-zone. In T. A. Anderson and J. R. Coats [eds.], *Bioremediation through Rhizosphere Technology* pp. 132-141.
- Schwitzguebel, J. P., J. Kumpiene, E. Comino, and T. Vanek. 2009.** From green to clean: a promising and sustainable approach towards environmental remediation and human health for the 21(st) century. *Agrochimica* 53: 209-237.
- Shao, H., X. Z. He, L. Achnine, J. W. Blount, R. A. Dixon, and X. Q. Wang. 2005.** Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 17: 3141-3154.
- Sharma, A., and M. B. Rehman. 2009.** Laboratory scale bioremediation of diesel hydrocarbon in soil by indigenous bacterial consortium. *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 766-769.
- Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley, and C. A. Dowd. 2001.** Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360: 1-16.
- Shelton, D.R., Karns, J.S., Hapeman-Somich, C.J. 1992.** Pesticide waste management. Technology and Regulation. Biological methods for the disposal of coumaphos waste. Ed. J.B. Bourke, A.S. Felsot, T.J.Gilding, J.K. Jensen and J.N. Seiber. ACS Symp. Ser.n° 510, 216-223.
- Sicbaldi, F., G. A. Sacchi, M. Trevisan, and A. A. M. DelRe. 1997.** Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes. *Pesticide Science* 50: 111-119.
- Siciliano, S. D., H. Goldie, and J. J. Germida. 1998.** Enzymatic activity in root exudates of Dahurian wild rye (*Elymus dauricus*) that degrades 2-chlorobenzoic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 5-7.
- Siciliano, S. D., J. J. Germida, K. Banks, and C. W. Greer. 2003.** Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 483-489.

- Simonich, S. L., and R. A. Hites. 1995.** Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science & Technology* 29: 2905-2914.
- Simonnot M.O, Croze V. 2008.** Procédés de traitements physiques et chimiques des sols pollués. *Techniques de l'ingénieur*, vol. JB5, n°J3981, [Note(s) : J3981.1-J3981.21]. Paris.
- Singer, A. C., I. P. Thompson, and M. J. Bailey. 2004.** The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation. *Current Opinion in Microbiology* 7: 239-244.
- Singh, G., T. S. Kathpal, W. F. Spencer, and J. S. Dhankar. 1991.** Dissipation of some organochlorine insecticides in cropped and uncropped soil. *Environmental Pollution* 70: 219-239.
- Singh, N. 2003.** Enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers in rhizosphere soil of *Kochia* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 775-782.
- Sinha, S. 2002.** Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46: 281-288.
- Slater, H., T. Gouin, and M. B. Leigh. 2011.** Assessing the potential for rhizoremediation of PCB contaminated soils in northern regions using native tree species. *Chemosphere* 84: 199-206.
- Sommer, C., and H. Gorisch. 1997.** Enzymology of the degradation of (di)chlorobenzenes by *Xanthobacter flavus* 14p1. *Archives of Microbiology* 167: 384-391.
- Sommet de Paris. 1972.** Sommet européen de Paris (19-21 octobre 1972) *Bulletin des Communautés européennes*. Octobre 1972, n° 10. Luxembourg: Office des publications officielles des Communautés européennes. Copyright: (c) Communautés européennes
- Soukup, A., O. Votrubova, and H. Cizkova. 2002.** Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153: 277-287.
- Soukup, A., W. Armstrong, L. Schreiber, R. Franke, and O. Votrubova. 2007.** Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist* 173: 264-278.
- Spain, J. C., and S. F. Nishino. 1987.** Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1010-1019.
- Stazi, S. R., P. Fevereiro, G. G. Sermanni, and R. A. Barros. 2001.** Oxidative polymerization and partial dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol by a mixture of peroxidase isozymes from *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76: 210-214.

- Steyaert, N. L. L., M. Hauck, S. W. H. Van Hulle, and A. J. Hendriks. 2009.** Modelling bioaccumulation of semi-volatile organic compounds (SOCs) from air in plants based on allometric principles. *Chemosphere* 77: 727-732.
- STF 1991.** Soil Transport and Fate Database and Model Management System, Environmental Systems and Technologies. CD.
- Stottmeister, U., A. Wiessner, P. Kuschik, U. Kappelmeyer, M. Kastner, O. Bederski, R. A. Muller, and H. Moormann. 2003.** Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22: 93-117.
- Strand, S.E., Newman, L., Ruszaj, M., Wilmoth, J., Shurtleff, B., Brandt, M., Choe, N., Ekuan, G., Duffy, J., Massman, J.W., Heilman, P.E., Gordon, M.P., 1995.** Removal of trichloroethylene from aquifers using trees. In: Vidic, R.D., Pohland, F.G. (Eds.), *Innovative Technologies for Site Remediation and Hazardous Waste Management*, Proceedings of the National Conference of the Environmental Engineering Division of the American Society of Civil Engineers, Pittsburgh, PA, New York, NY
- Sulmon, C., G. Gouesbet, I. Couee, and A. El Amrani. 2004.** Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on psbA mRNA and D1 protein levels. *Plant Science* 167: 913-923.
- Sulmon, C., G. Gouesbet, F. Binet, F. Martin-Laurent, A. El Amrani, and I. Couee. 2007.** Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* 145: 507-515.
- Sun, J. H., J. L. Feng, Q. Liu, and Q. L. Li. 2010.** Distribution and sources of organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from upper reach of Huaihe River, East China. *Journal of Hazardous Materials* 184: 141-146.
- Sunohara, Y., and H. Matsumoto. 2008.** Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry* 69: 2312-2319.
- Susarla, S., V. F. Medina, and S. C. McCutcheon. 2002.** Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18: 647-658.
- Taghavi, S., T. Barac, B. Greenberg, B. Borremans, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2005.** Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8500-8505.
- Taghavi, S., C. Garafola, S. Monchy, L. Newman, A. Hoffman, N. Weyens, T. Barac, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2009.** Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 748-757.

- Talano, M. A., S. Frontera, P. Gonzalez, M. I. Medina, and E. Agostini. 2010.** Removal of 2,4-diclorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *Journal of Hazardous Materials* 176: 784-791.
- Tam, D. D., W. Y. Shiu, K. Qiang, and D. Mackay. 1996.** Uptake of chlorobenzenes by tissues of the soybean plant: Equilibria and kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 489-494.
- Tasli, S. 1995.** Devenir de l'atrazine en culture de maïs : études en plein champ-site de la Côte Saint-André, Isère, France et au laboratoire. Recherche de solutions alternatives de traitement. Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Tasli, S., P. Ravanel, M. Tissut, J. L. Thony, and B. Garino. 1996.** Atrazine movement and dissipation in a sandy loam soil under irrigation: An immunoenzymatic study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 359-366.
- Thom, R., I. Cummins, D. P. Dixon, R. Edwards, D. J. Cole, and A. J. Laphorn. 2002.** Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry* 41: 7008-7020.
- Thomé, O.W., 1885.** Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 1885, Gera, Germany
- Tissut, M., M. Raveton, and P. Ravanel. 2006.** Ecoremediation. Cooperation between plants and soil microorganisms, molecular aspects and limits, pp. 489-504. *In* I. Twardowska, H. E. Allen, M. M. Haggblom and S. Stefaniak [eds.], *Viable Methods of Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*.
- Toba H.H., Pike K.S., and O'Keeffe L.E. 1988.** Carbosulfan, fonofos, and lindane wheat seed treatments for control of sugarbeet wireworm. *Journal of Agricultural Entomology* 5, 35-43.
- Tomlin, C. 1994.** The Pesticide Manual (4th edn.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1994) The British Crop Protection Council, Surrey.
- Toyama, T., Y. Sato, D. Inoue, K. Sei, Y. C. Chang, S. Kikuchi, and M. Ike. 2009.** Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108: 147-150.
- Trapp, S., and M. Matthies. 1995.** Generic one-compartment model for uptake of organic-chemicals by foliar vegetation. *Environmental Science & Technology* 29: 2333-2338.
- Trapp, S. 2004.** Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research* 11: 33-39.
- Turgut, C., L. Atatanir, and T. J. Cutright. 2010.** Evaluation of pesticide contamination in Dilek National Park, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 170: 671-679.

- Ucisk, A. S., and S. Trapp. 2008.** Uptake, removal, accumulation, and phytotoxicity of 4-chlorophenol in willow trees. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 619-627.
- Udomsinprasert, R., S. Pongjaroenkit, J. Wongsantichon, A. J. Oakley, L. Prapanthadara, M. C. J. Wilce, and A. J. Ketterman. 2005.** Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochemical Journal* 388: 763-771.
- Ullmann .1986.** Ceramics to chlorohydrins. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim (Germany), VCH. W. Gerhartz, vol A6, pp. 328, 330, 376, 5th Ed.
- UNEP de Genève. 2007.** Programme des Nations Unies pour l'environnement. Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants Comité d'étude des polluants organiques persistants. Troisième réunion Genève, 19-23 novembre 2007
- UNEP de Genève. 2009.** Programme des Nations Unies pour l'environnement. Conférence des Parties à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants Quatrième réunion Genève, 4-8 mai 2009
- Urlacher, V. B., S. Lutz-Wahl, and R. D. Schmid. 2004.** Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 317-325.
- US Environmental Protection Agency. 1983, 1996, 2000.** <http://www.epa.gov>
- Van Aken, B., and S. L. Doty. 2010.** Transgenic plants and associated bacteria for phytoremediation of chlorinated compounds, pp. 43-64. *In* S. E. Harding and M. P. Tombs [eds.], *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol 26.
- Van der Meer, J. R., C. Werlen, S. F. Nishino, and J. C. Spain. 1998.** Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4185-4193.
- Verma, A., and M. K. K. Pillai. 1991.** Bioavailability of soil-bound residues of DDT and HCH to certain plants. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 347-351.
- Verschuere K. 1996.** *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. New York, Van Nostrand Reinhold Co. 3rd Ed.
- Vidali, M. 2001.** Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73: 1163-1172.
- Vijgen J. 2002.** Evaluation of demonstrated and emerging remedial action technologies for the treatment of contaminated land and groundwater (Phase III). <www.cluin.org/download/techdrct/vijgen/vijgentext.pdf>, consulté le 01/10/03.

- Vijgen, J., P. C. Abhilash, Y. F. Li, R. Lal, M. Forter, J. Torres, N. Singh, M. Yunus, C. G. Tian, A. Schaffer, and R. Weber. 2010.** Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 152-162.
- Vizcaino, P., and A. Pistocchi. 2010.** A GIS model-based assessment of the environmental distribution of gamma-hexachlorocyclohexane in European soils and waters. *Environmental Pollution* 158: 3017-3027.
- Vlieg, J., and D. B. Janssen. 2001.** Formation and detoxification of reactive intermediates in the metabolism of chlorinated ethenes. *Journal of Biotechnology* 85: 81-102.
- Vogel, S. 2004.** Contributions to the functional anatomy and biology of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) I. Pathways of air circulation. *Plant Systematics and Evolution* 249: 9-25.
- Vogel-Mikus, K., M. Regvar, J. Mesjasz-Przybylowicz, W. J. Przybylowicz, J. Simcic, P. Pelicon, and M. Budnar. 2008.** Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. *New Phytologist* 179: 712-721.
- Waliszewski, S. M. 1993.** Residues of lindane, HCH isomers and HCB in the soil after lindane application. *Environmental Pollution* 82: 289-293.
- Walker, K., D. A. Vallero, and R. G. Lewis. 1999.** Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science & Technology* 33: 4373-4378.
- Walton, B. T., and T. A. Anderson. 1990.** Microbial-degradation of trichloroethylene in the rhizosphere - potential application to biological remediation of waste sites. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1012-1016.
- Wang, J. T., Y. P. Jiang, S. C. Chen, X. J. Xia, K. Shi, Y. H. Zhou, Y. L. Yu, and J. Q. Yu. 2010.** The different responses of glutathione-dependent detoxification pathway to fungicide chlorothalonil and carbendazim in tomato leaves. *Chemosphere* 79: 958-965.
- Wang, M. J., and K. C. Jones. 1994a.** Uptake of chlorobenzenes by carrots from spiked and sewage sludge-amended soil. *Environmental Science & Technology* 28: 1260-1267.
- Wang, M. J., and K. C. Jones. 1994b.** Behavior and fate of chlorobenzenes (CBs) introduced into soil-plant systems by sewage-sludge application - a review. *Chemosphere* 28: 1325-1360.
- Wang, M. J., and K. C. Jones. 1994c.** Occurrence of chlorobenzenes in 9 united-kingdom retail vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2322-2328.

- Wang, M. J., and K. C. Jones. 1994d.** Behavior and fate of chlorobenzenes in spiked and sewage sludge-amended soil. *Environmental Science & Technology* 28: 1843-1852.
- Wang, M. J., M. Bokern, C. Boehme, K. C. Jones, and H. Harms. 1996.** Phytotoxicity, uptake and metabolism of 1,4-dichlorobenzene by plant cells. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 1109-1114.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261-5267.
- Wang, X. Q. 2009.** Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *Febs Letters* 583: 3303-3309.
- Webster, E., Mackay, D., and Wania, F. 1998.** Evaluating environmental persistence. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 2148-2158.
- Wedscott, N. D. 1985.** Gamma-HCH in rape seedlings grown from treated seeds. *Pesticide Science* 16: 416-421.
- Weishaar, J.A., D. Tsao, and J.G. Burken. 2009.** Phytoremediation of BTEX hydrocarbons: potential impacts of diurnal groundwater fluctuations on microbial degradation. *International Journal of Phytoremediation*, Vol 11, pp. 509-523
- Wenzel, W. W. 2009.** Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil* 321: 385-408.
- Westcott, N. D. 1985.** Gamma-HCH in rape seedlings grown from treated seeds. *Pesticide Science* 16: 416-421.
- Weyens, N., J. Dupae, D. van der Lelie, L. Newman, S. Taghavi, and J. Vangronsveld. 2010.** Endophytic bacteria strongly reduce TCE evapotranspiration during phytoremediation in the field. *Journal of Biotechnology* 150: S51-S51.
- White, R. K. 1992.** Handbook of environmental fate and exposure data for organic-chemicals, vol 2, solvents - howard, ph. *Risk Analysis* 12: 163-163.
- Whyte, L. G., T. H. M. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C. W. Greer, and J. B. van Beilen. 2002.** Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5933-5942.
- Willett, K. L., E. M. Ulrich, and R. A. Hites. 1998.** Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science & Technology* 32: 2197-2207.
- Williams, J. B. 2002.** Phytoremediation in wetland ecosystems: Progress, problems, and potential. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 607-635.

- Wilson, C. P., Whitwell, T., and Klaine, S. J. 1999.** Phytotoxicity, uptake, and distribution of ^{14}C simazine in *Canna hybrida* "Yellow King Humbert". *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1462-1468.
- Wilson, S. C., and A. A. Meharg. 2003.** Investigation of organic xenobiotic transfers, partitioning and processing in air-soil-plant systems using a microcosm apparatus. Part II: comparing the fate of chlorobenzenes in grass planted soil. *Chemosphere* 53: 583-591.
- Winterbourn, C. C. 2008.** Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* 4: 278-286.
- Wolf, A. E., K. J. Dietz, and P. Schröder. 1996.** Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *Febs Letters* 384: 31-34.
- Wood, T. K. 2008.** Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 572-578.
- Wood, Z. A., L. B. Poole, and P. A. Karplus. 2003.** Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300: 650-653.
- Yan, Z. S., H. Y. Guo, T. S. Song, Y. Hu, and H. L. Jiang. 2011.** Tolerance and remedial function of rooted submersed macrophyte *Vallisneria spiralis* to phenanthrene in freshwater sediments. *Ecological Engineering* 37: 123-127.
- Yu, Q., I. Abdallah, H. P. Han, M. Owen, and S. Powles. 2009.** Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230: 713-723.
- Yu, X. Z., and J. D. Gu. 2006.** Uptake, metabolism, and toxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) in weeping willows. *Journal of Hazardous Materials* 137: 1417-1423.
- Yuan, J. S., P. J. Tranel, and C. N. Stewart. 2007.** Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12: 6-13.
- Zayed, A. M., and N. Terry. 1994.** Selenium volatilization in roots and shoots - effects of shoot removal and sulfate level. *Journal of Plant Physiology* 143: 8-14.
- Zhang, J. Y., W. Zhao, J. Pan, L. M. Qiu, and Y. M. Zhu. 2005.** Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environment International* 31: 855-860.
- Zhang, N., Yang, Y., Tao, S., Liu, Y., Shi, K.L. 2011.** Sequestration of organochlorine pesticides in soils of distinct organic carbon content. *Environ. Pollut.* 159, 700-705
- Zhou, X., S. B. Deng, J. Huang, G. Yu, and H. L. Lv. 2009.** Occurrence and Distribution of Chlorobenzenes in the Tonghui River of Beijing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 32-41.

Zimmermann, P., and U. Zentgraf. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10: 515-534.

Zukowska, B., J. Pacyna, and J. Namiesnik. 2005. Modelling of migration and fate of selected persistent organic pollutants in the Gulf of Gdansk and the Vistula catchment (Poland): selected results from the EU ELOISE EuroCat project. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 62: 467-476.

Annexe 1

COST Action 859 – WG4 + MC meetings

Phytotechnologies in practice – biomass production, agricultural methods, legacy, legal and economic aspects

October 14-17, 2008 Verneuil-en-Halatte, France



Organochlorines:

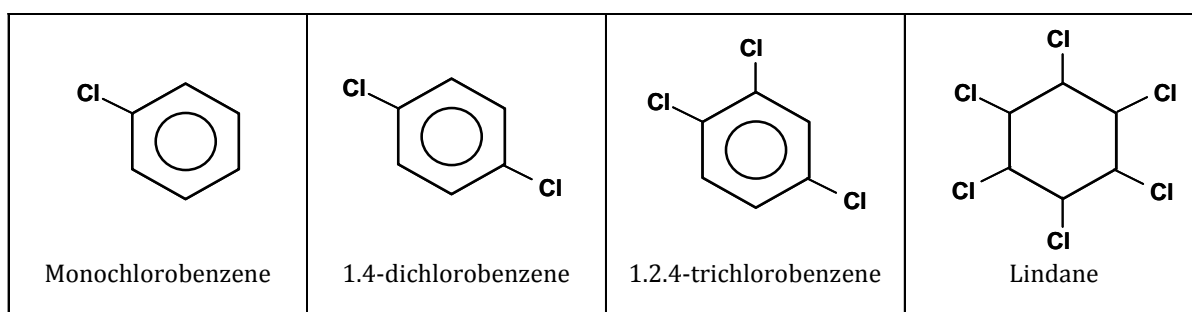
Study of a potential remediation by plants

Angélique SAN-MIGUEL, Muriel RAVETON, Stéphane REYNAUD, Michel TISSUT, Patrick RAVANEL

Laboratoire d'Écologie Alpine (CNRS UMR 5553), Equipe Perturbations Environnementales et Xénobiotiques, Université Joseph Fourier, BP53-38041 Grenoble Cedex 09

Organochlorine molecules are frequently found in atmosphere (Popp et al., 2000), vegetables (Wang and Jones, 1994), rivers (Meharg et al., 2000) and sediments (Lee and Fang, 2000).

Chlorobenzenes (CBs), as monochlorobenzene, 1,4-dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, and Lindane are relatively volatile, chemically stable and lipophilic (Log Kow : 2.85, 3.42, 4.05, 3.7 respectively). Because of the acute toxicity of CBs and Lindane, some researches concerning their remediation from contaminated areas have been conducted.



In a first attempt, we considered in our laboratory experiments, the capacity of phytoremediation using several type of plants (Maize, Wheat, Phragmites, Typha). The phytotoxicity of such molecules was measured (germination rate, fresh and dry weight, kinetics of development (roots, leaves), pigment contains, oxidative stress....) to determine which kind of plant would be the best candidate for phytoremediation of soil, sediment and water contaminated by organochlorines. We also considered the impact of a mixture of organochlorines on the plant development.

Therefore, some experiments were performed to evaluate the organochlorines uptake by plants. A bioaccumulation of these compounds in roots was measured by following the kinetics of penetration.

Keywords: Organochlorines, phytoextraction, phytotoxicity

Annexe 2

COST Action 859

Phytotechnologies to Promote Sustainable Land Use and Improve Food Safety
April / July 2009 - Short Term Scientifics mission (STSM)

Helmholtz Zentrum München

(AMP) «Abteilung Mikrobe-Pflanzen Interaktionen»



Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg

Organochlorines impact on enzymatic activity in *Phragmites australis* tissues

The second phase of the metabolism, (phase II), has been highlighted in this study detected conjugates in different parts of the plant, and the preliminary results are quite interesting. Indeed, it seems that OCs treatments are able in some cases (example with UGT activity) to increase or activate enzymatic activities in the plant. This is the case of lindane and DCB treatment especially in the rhizomes part. The exposition duration could be a factor which explains these observations, not enough to have a better activity in the leaves (7 days). Close to the rhizosphere, bacteria can play a metabolism role which can also explain the differences observed between the compartments. More replicates with other culture conditions can answer our question. Therefore, some studies (Petroutsos 2007, 2008) showed that in algae, a conjugation is possible with the hydroxylation form of the DCB, which corresponds to the result product after the phase I of metabolism. The second observation concerned the inhibition of the glycosyltransferase production with the TCB and MCB treatment. The inhibition is observed especially in the rhizomes and could be caused by the concentration of pollutant not enough to see morphological effects after 7 days, but enough to see an effect on the detoxification enzymes production. Therefore, it has been demonstrated as before with the DCB, that a conjugation is possible with the hydroxylated form of the TCB. It would be also interesting to do other experiments to verify this hypothesis. With the mixture

(MIX), it's interesting to see the important induction of the glycosyltransferase activity in the leaves to compare with the control, but in the rhizomes the inhibition still important. A shorter exposition time could be, in this case, interesting to see if we obtained comparable results as described before. Maybe the OCs concentrations are not too high to observe something in the leaves, and to activate the enzyme of detoxification.

Keywords: Organochlorines, enzymatic detoxification, GST, UGT

Annexe 3

COST Action 859 – Phyto 2009 – Final International Conference
Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety
October 11-16, 2009 Centro Stefano Franscini, Monte Verità, Ascona, Switzerland



**Purifying capacity of a water/soil/plant system, in relation to organochlorines:
Analyses of eco-remediation potentials.**

A. San Miguel^a, P. Schröder^b, P. Ravanel^a and M. Raveton^a

^a*LECA, Environmental perturbations & Xenobiotics, University Joseph Fourier, BP 53X, 38041
Grenoble Cedex 09, France*

^b*Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen, Helmholtz-Zentrum München, Deutsches
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Ingolstaedter Landstrasse 1, D-85758
Neuherberg, Germany*

The aim of this research is to investigate the organochlorines eco-remediation by plant rhizosphere. Such a research requires a multidisciplinary approach integrating microbiology, chemistry and plant physiology studies. Using standard organochlorines (OCs) [lindane, monochloro-, dichloro-, trichloro-benzenes (MCB, DCB, TCB)], this experimental program was carried out in order to reveal tolerant plant species. A first description of OCs impacts was based on morphological effects (biomass, chlorophyll contents, organ abnormalities). Therefore, Non Observed Effect Concentrations were statistically established (hydroponic culture) for wheat and maize and were 0.7 mg/l for lindane, 10 mg/l for TCB and 0.8 mg/l for DCB. The OCs mixture NOEC was evaluated to reach 0.175 mg/l lindane + 2.5 mg/l TCB + 0.2 mg/l DCB + 0.2 mg/l MCB. In the COST859 STSM framework presented here, OCs impacts on the plant physiological mechanisms would be studied to highlight detoxification enzyme inductions (mono- and multi-expositions). Apparently, OCs pesticides are quite recalcitrant to detoxification by terrestrial plant and marine phytoplankton [1]. Nevertheless, they induced some particular enzyme activities, glutathione-S-transferases (GST) [2], or could inhibit UDP-glycosyltransferases (UGT) as it was the case in other organisms [3]. A better understanding of the OCs induction/inhibition of plant enzymes could be helpful to elucidate chemical impact mechanisms. Moreover, glutathione (GSH) is known to be an

important antioxidant molecule which is able to alleviate oxidative damage in the plant tissue. Therefore, measuring precisely the balance level of GSH/GSSG will be necessary to evaluate the oxidative stress.

- [1]Chaudhry Q., Schröder P., Werck-Reichhart D., Grajek W., Marecik R. (2002) Prospects and Limitations of Phytoremediation for the Removal of Persistent Pesticides in the Environment. *Environmental Science and Pollution Research* 9(1), 4-17.
- [2]Sinha S. (2002) Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* 46, 281-288.
- [3]Qian Y., Yin D., Li Y., Wang J., Zhang M., Hu S. (2004) Effects of four chlorobenzenes on serum sex steroids and hepatic microsome enzyme activities in crucian carp, *Carassius auratus*. *Chemosphere* 57, 127-133.

Annexe 4

COST Action 859 – Phyto 2009 – Final International Conference
Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety
October 11-16, 2009 Centro Stefano Franscini, Monte Verità, Ascona, Switzerland



Ecoremediation.
Organochlorines impacts on plant rhizosphere microflora communities.

A. San Miguel^a, R. Geremia^a, P. Ravanel^a and M. Raveton^a

^aLECA, Environmental perturbations & Xenobiotics, University Joseph Fourier, BP 53X,
38041 Grenoble Cedex 09, France

The aim of this research is to investigate the organochlorines eco-remediation by plant rhizosphere. Such a research requires a multidisciplinary approach integrating microbiology, chemistry and plant physiology studies. Using standard organochlorines (OCs) [lindane, monochloro-, dichloro-, trichloro-benzenes (MCB, DCB, TCB)], rhizosphere microflora associated to *Phragmites australis* and *Zea mays* plants was studied. Samples were collected *in natura* on plants exposed to a concentration of 15µg OCs/g dw during 45 days. Single Strand Conformational Polymorphism analyses demonstrated that OCs had an impact on the bacteria communities associated to plant roots. Furthermore, bacteria from control and treated plants were isolated and cultivated on rich medium substrates. 16S RNA sequence analyses showed the presence of a large diversity of bacteria (Table 1). Some of these genus (*Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*) were already known to be involved in the detoxification pathways of OCs [1,2,3], while Flavobacteria seemed to be sensitive to the presence of OCs mixtures. Nowadays, cultivated bacteria strains were tested on rich and poor media contaminated by OCs (either a single molecule or the mixture of different compounds) to confirm their sensitivity or their capacity to use OCs as a C-nutrient source.

Table 1. Rhizosphere microflora detected in the rhizosphere of plants exposed to OCs mixture (15 µg/g dw soil, 45 days) and of control plants.

Bacteria Phylum	<i>Phragmites australis</i>		<i>Zea mays</i>	
	Control	Organochlorine exposition	Control	Organochlorine exposition
Alphaproteobacteria	+	+	+	-
Flavobacteria	+	-	-	-
Actinobacteria	+	+	-	-
Gammaproteobacteria	+	+	-	-
Betaproteobacteria	+	+	+	+
Firmicutes	-	+	+	+

- [1] Nawab A., Aleem A., Malik A. (2003) Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to c-HCH degradation by *Pseudomonas* strains. Bioresource Technology 88, 41-46.
- [2] Phillips T.M., Seech A.G., Lee H., Trevors J.T. (2005) Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. Biodegradation 16, 363-392.
- [3] Manickam N., Misra R., Mayilraj S. (2007) A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12. Journal of Applied Microbiology 102, 1468-1478.

Annexe 5

The International Phytotechnology Society

7th International Conference on Phytotechnologies "Phytotechnologies in the 21st century: challenges after Copenhagen 2009. Remediation – Energy – Health – Sustainability"

September 26-29, 2010 University of Parma, Italy



Plant and organochlorines, uptake vs phytotoxicity

San Miguel A.*, M. Faure, P. Ravanel, M. Raveton

**Presenting author: LECA, Environmental perturbations & Xenobiotics, University Joseph Fourier, BP 53X, 38041 Grenoble Cedex 09, France*

Organochlorines (OCs) are known to be persistent organic pollutants due to their high lipophilicity and stability. Therefore, solutions to restore polluted system by biotechnologies are studied especially using plant materials. For this purpose, phytoremediation of standard organochlorines (OCs) [lindane, monochloro-, dichloro- and trichloro-benzenes (MCB, DCB, TCB)] was experimented. Screening of plant species adapted to OCs exposition (biomass and morphological criteria) permitted to select *Zea mays* as a relatively tolerant plant. Therefore, ROS, GPX and GdR analyses shown that OCs could induce an oxidative stress on root tissues. Moreover, root cell viability was strongly dependent on the OCs concentrations. Using biomass and oxidative stress indicators, *Z. mays* could be a good plant candidate to phytoextract those pollutants. Finally, OCs phytoremediation could be considered in area with a pollution range comprised between 0 to 30 mg kg⁻¹.

Keywords: Organochlorines, *Zea mays*, uptake, oxidative stress, cell viability